

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie



Bc. Tereza Beranová

DERIVÁTY TACN S AMINOFOSFINÁTOVÝMI PENDANTNÍMI SKUPINAMI

TACN derivatives bearing aminophosphinate pendant arms

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 4. 5. 2016

Bc. Tereza Beranová

Abstrakt

Tato práce se zabývá přípravou a studiem koordinačních vlastností derivátů makrocyclu TACN s aminofosfinátovými pendantními rameny. Byly připraveny dva ligandy se dvěma NODP^{am} a se třemi NOTP^{am} pendantními rameny. Z důvodu rozpadu ligandu NODP^{am} již při jeho přípravě, byl dále studován pouze ligand NOTP^{am}. Byly studovány jeho acidobazické vlastnosti a stabilita komplexů s hlinitými a gallitými ionty. Byla provedena studie rychlosti formace a disociace. Následně byla studována koordinace fluoridových aniontů na hlinitý komplex pomocí iontově selektivní fluoridové elektrody. Na závěr byla ¹⁹F a ²⁷Al NMR spektroskopii studována koordinace komplexu AlF_x ligandem NOTP^{am}. Pro srovnání byly vybrané studie provedeny i s ligandem NOTA.

Klíčová slova: makrocyclické komplexy, pozitronová emisní tomografie, fosfinové kyseliny

Abstract

The aim of this work was studying of the coordination properties of TACN macrocyclic derivatives with aminophosphinate pendant arms. Two ligands were prepared, one with two pendant arms NODP^{am} and one with three pendant arms NOTP^{am}. Because of degradation of ligand NODP^{am} during its synthesis, only the ligand NOTP^{am} was studied further. Acid-base properties of ligand and thermodynamic stability of aluminium and gallium complexes were studied. Formation and dissociation studies were performed with the complexes. Coordination of fluoride ions to aluminium complex was studied using ion selective fluoride electrode. Finally coordination of complex AlF_x with ligand NOTP^{am} was studied using ¹⁹F and ²⁷Al NMR spectroscopy. Selected experiments were made also with ligand NOTA.

Key words: macrocyclic complexes, positron emission tomography, phosphinic acids

Obsah

1.	Úvod	7
1.1.	Kontrastní látky pro pozitronovou emisní tomografii	7
1.2.	^{18}F kontrastní látky	9
1.2.1.	^{18}F -Alfatide	12
1.3.	^{68}Ga kontrastní látky	14
1.3.1.	DOTA deriváty	15
1.3.2.	NOTA deriváty	17
1.4.	Cíl práce	20
2.	Experimentální část	22
2.1.	Chemikálie a metody	22
2.2.	Příprava roztoků	25
2.3.	Studium vlastností ligandu NOTP ^{am} , NOTA a jejich komplexů	27
2.4.	Syntéza	29
3.	Výsledky a diskuze	35
3.1.	Příprava ligandů NODP ^{am} a NOTP ^{am}	35
3.2.	Příprava komplexu Ga–NOTP ^{am}	37
3.3.	Stabilita ligandu NOTP ^{am}	38
3.4.	Acidobazické vlastnosti	38
3.5.	Stabilita komplexů	40
3.6.	Formace a disociace komplexů	43
3.7.	Koordinační studie fluoridových aniontů	47
4.	Závěr	52
5.	Literatura	53

Zkratky

TACN	1,4,7-triazacyklononan
Chelaton 3	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
NMR	nukleární magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
NOTA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová
DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
Bn	benzyl
Me	methyl
Et	ethyl
Ac	acetyl
<i>t</i> Bu	tercbutyl
<i>i</i> Pr	isopropyl
FDG	deoxyfluorglukosa
CT	počítačová tomografie
MRI	magnetická rezonance
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PTFE	polytetrafluorethylen

1. Úvod

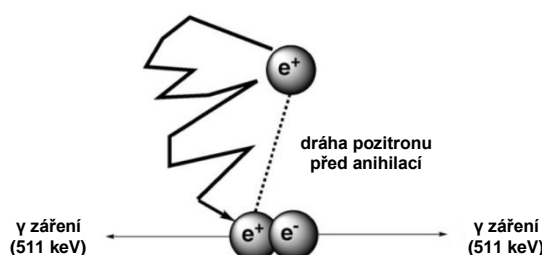
1.1. Kontrastní látky pro pozitronovou emisní tomografii

Pozitronová emisní tomografie je zobrazovací technika, která monitoruje především fyziologické a biochemické děje. Tato metoda využívá farmaka obsahující radioizotopy, které při svém rozpadu vyzáří pozitrony tzv. pozitronové zářiče. Pozitron následně v těle pacienta anihiluje s elektronem za uvolnění dvou fotonů o stejné energii (511 keV) a dráhy svírající úhel 180° . Toto gamma záření je pak detekováno prstencovým detektorem, přičemž zaznamenány jsou pouze ty fotony, které dopadají na detektor ve stejný okamžik. Tím je zajištěna vysoká přesnost detekce.^[1–4] Pozitronová emisní tomografie je nejcitlivější metoda pro měření metabolických procesů *in vivo*. Dokáže detekovat koncentrace v řádech 10^{-12} M a díky tomu je dávka radiofarmaka podávaná pacientovi extrémně nízká, v řádech nanogramů.^[2]

Limitujícím faktorem pro PET je však jeho rozlišení, které se odvíjí od použitého radioizotopu. Tyto pozitronové zářiče se liší nejen poločasem rozpadu, ale také energií uvolňovaných pozitronových částic viz Tab. 1. Pozitron o dané energii se uvolní z radiofarmaka, čímž získává určitou hybnost a urazí tak v těle pacienta nezanedbatelnou vzdálenost, než se srazí s elektronem a uvolní detekovatelné gamma záření. Skutečným místem detekce je tedy srážka s elektronem a ne uvolnění pozitronu v místě radiofarmaka, a proto získáváme mírně zkreslený obraz, viz Obr. 1. Mírou tohoto rozostření je právě energie pozitronové částice, čím je větší, tím větší vzdálenost urazí a tím je rozlišení nižší.^[1–4]

Tab. 1 – Radioizotopy používané pro PET, jejich poločasy rozpadu a energie pozitronů.

radioizotop	poločas rozpadu [min]	max. energie [MeV]
^{11}C	20,3	0,97
^{13}N	10	1,20
^{15}O	2	1,74
^{18}F	110	0,64
^{64}Cu	762	0,66
^{68}Ga	68,1	1,90

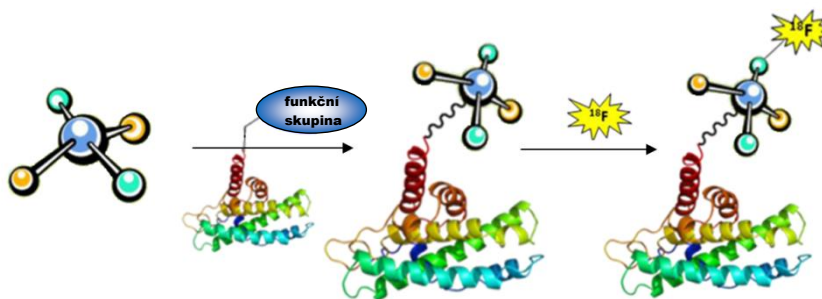


Obr. 1 – Pozitron uvolněný z radioizotopu urazí v těle nezanedbatelnou vzdálenost, než anihiluje s elektronem. Tato vzdálenost je limitem dosažitelného rozlišení v rámci PET vzhledem k fyzikálním vlastnostem rozpadajícího se jádra. Převzato z ref. [2].

Jak již bylo uvedeno, PET zobrazuje především fyziologické děje. Ty jsou však bez anatomické struktury poměrně těžko čitelné, proto se PET kombinuje s jinými technikami jako je CT nebo MRI. Tyto hybridní metody následně poskytují jak anatomický tak fyziologický obraz a to již během jednoho skenování.^[1,2]

Nejhojněji využívané radioizotopy pro PET se dají rozdělit na kovové jako jsou ^{64}Cu , ^{68}Ga a nekovové jako ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F . U nekovových izotopů je při syntéze radiofarmak využíváno skutečnosti, že radioaktivní izotop je v podstatě nerozeznatelný od přirozeného izotopu. Proto záměnou ^{11}C za přirozený izotop ^{12}C u molekuly, která se běžně vyskytuje v lidském organismu, získáme látku, která bude totožná s původní molekulou, ale zároveň bude i takzvaně PET aktivní. Takto lze modifikovat molekuly v lidském těle a sledovat jejich fyziologické a biochemické chování. Podobné skutečnosti bylo využito i v případě komerčně nejvyužívanější PET kontrastní látky ^{18}F -deoxyfluoroglukosy (^{18}F -FDG), která vzniká záměnou hydroxylové skupiny za fluór. Tato výměna je bioisosterická^[2], a proto tělo nerozliší mezi fluorovanou a přírodní glukózou a ^{18}F -FDG je distribuována v těle stejně. Rozdíl nastává až při metabolických procesech jako je glykolýza.^[5] Navíc vazba C–F je jednou z nejpevnějších v organické chemii, a proto je velice nepravděpodobné, že by docházelo ke štěpení této vazby a uvolnění tak volného radioizotopu do těla.^[2] Poměrně značnou bariérou tohoto přístupu je však příprava těchto látek. Ta zahrnuje časově náročnou organickou syntézu, kterou je, vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu izotopů, viz Tab. 1, obtížné zvládnout.^[3]

Proto se vyvinul další směr a to je příprava kontrastních látek, které by se dali v těle přímo cílit na určený substrát. Dochází tak k vývoji tzv. prostetických skupin, zpravidla strukturně jednodušších molekul obsahujících vázaný radioizotop, které jsou navázány na specifický nosič (peptid, protein), jenž je vhodným substrátem pro cílený receptor v těle, viz Obr. 2.



Obr. 2 – Schéma přípravy značených peptidů. Prostetická skupina reaguje s peptidem a následně je označena radioaktivním izotopem. Vzniká tak vysoce specifické radiofarmakum, které lze v těle cílit v závislosti na použitém peptidu. Převzato z ref. [7].

Prostetickou skupinou může být organická molekula, nicméně může mít podobu i komplexní částice.^[2,3,6–8] Druhý případ je vhodný mimo jiné i pro kovové radioizotopy, které mohou být komplexovány vhodnými ligandy. Struktura ligandu je modifikována tak, aby

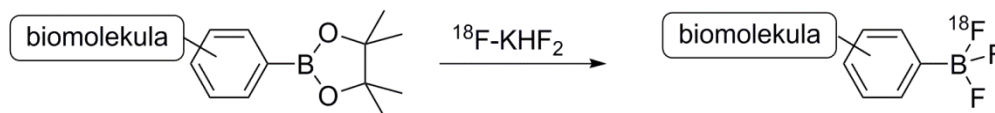
komplexace probíhala co nejrychleji, zároveň však komplex musí být stabilní a kineticky inertní, aby nedošlo k uvolnění radioizotopu v těle. Výhodou této metody je především značení radioizotopem až v posledním kroku, což je žádané nejen kvůli minimální časové zátěži, ale také z důvodu bezpečnosti práce s vysokoenergetickým radioaktivním materiálem o krátkém poločasu rozpadu. V praxi je toto značení prováděno roboticky či automatizovaným procesem v tzv. horkých celách, což jsou uzavřené olověné digestoře s tlustostěnnými olověnými skly.^[3]

1.2. ^{18}F kontrastní látky

Radioizotop ^{18}F je z pohledu fyzikálních vlastností nejvhodnějším jádrem pro PET. Jeho poločas rozpadu je 110 minut, což je dostatečná doba na přípravu kontrastní látky, její aplikaci pacientovi a zároveň distribuci po těle pacienta. ^{18}F se rozkládá z 97 % výhradně β^+ rozpadem, což znamená, že prakticky každá molekula obsahující ^{18}F je detekovatelná pomocí PET. Zároveň uvolněné pozitrony mají nejnižší energii v rámci použitelných PET radioizotopů tj. 0,64 MeV a tudíž ^{18}F umožňuje nejlepší rozlišení, jaké je v rámci PET možné dosáhnout. Radioaktivní izotop fluóru je produkován v cyklotronu nejčastěji ozařováním $^{18}\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ protony, výsledkem je radioaktivní fluoridový anion ve vodném prostředí. Takto připravený radioizotop však není vhodný pro nukleofilní reakce (stejně tak pro elektrofilní), které jsou hojně využívány v organické syntéze. Vodné prostředí oslabuje nukleofilní vlastnosti iontu, a proto musí být radioizotop převeden do aprotického rozpouštědla nejčastěji acetonitrilu. To je realizováno nanesením na silný aniontový iontoměnič, promytím bezvodým acetonitrem a následnou elucí roztokem komplexu draselného kryptandu (kryptofix: K 2.2.2). Účelem komplexu je vytvoření iontového páru s fluoridovým aniontem a zvýšení tak jeho rozpustnosti v aprotickém rozpouštědle. Odstranění zbytků vody je prováděno azeotropickou destilací.^[3,6,8] Bez tohoto časově náročného procesu se lze obejít, pokud je značení provedeno komplexací iontu $^{18}\text{F}^-$. Fluoridový anion může být koordinován pomocí tzv. fluorofilního prvku. Základem této metody je vysoká afinita fluoridového aniontu k prvkům, jako jsou bór, křemík či hliník. Tyto kovy a polokovy jsou v molekule buď kovalentně vázány C–X vazbou jako je tomu v případě bóru či křemíku nebo jsou chelatovány vhodnými ligandy, které zabraňují jejich uvolnění z komplexu. Takto připravené molekuly pak umožňují navázání či koordinaci fluoridového aniontu.^[6–8]

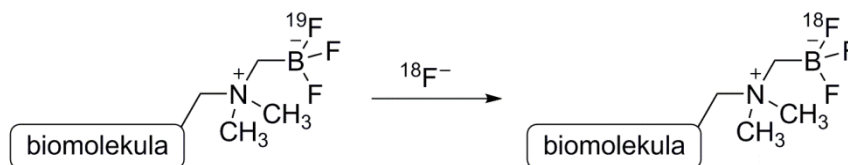
Vazba bóru k fluóru je nejsilnější známou kovalentní vazbou mezi dvěma prvky ($> 730 \text{ kJ/mol}$). Značení nejčastěji využívá nukleofilní reakce derivátu arylboronové kyseliny s fluoridovým aniontem, viz Obr. 3. Tato reakce probíhá částečně ve vodném prostředí (1:1 s organickým rozpouštědlem) a není tedy třeba azeotropického sušení. Nicméně dochází zde k „ředění“ radioaktivního izotopu $^{19}\text{F}-\text{KHF}_2$, čímž je snížen maximální radiochemický výtěžek. Toto omezení může být částečně kompenzováno faktem, že na jednu molekulu radiofarmaka připadají tři značené fluoridové anionty. Samotná reakce však probíhá velice

pomalu i při poměrně vysoké koncentraci reaktantů. Další nevýhodou je čištění produktu, které vyžaduje časově náročnou metodu HPLC.^[6,8]



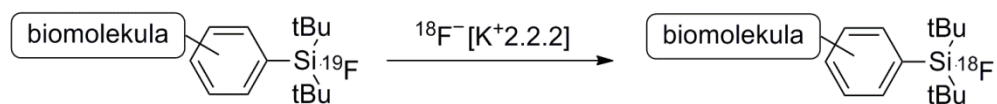
Obr. 3 – Značení biomolekuly pomocí bóru. Chráněný derivát arylboronové kyseliny reaguje s radioaktivním fluoridovým aniontem v podobě soli hydrogenfluoridu draselného za vzniku trifluoroborátového derivátu.

Novějším přístupem je pak využití skupiny amoniomethyltrifluoroborátu, který byl značen izotopovou výměnou fluoridového aniontu ve vodném prostředí, viz Obr. 4. Produkt byl čištěn na koloně s reverzní fází. Připravená radiofarmaka dosahovala vysoké čistoty > 98% a vysokých specifických aktivit ≥ 3 Ci/ μ mol (^{18}F -FDG má specifickou aktivitu zpravidla okolo 2,7 Ci/ μ mol)^{[6],[9]}



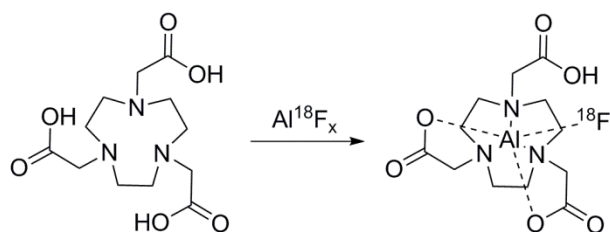
Obr. 4 – Další možnost značení biomolekuly za využití bóru. Izotopová výměna fluoridového aniontu v derivátu amoniomethyltrifluoroborátu.

I křemík tvoří silné vazby s fluórem (> 570 kJ/mol), nicméně na rozdíl od vazby B–F je vazba s křemíkem za podmínek *in vivo* náchylná k hydrolyze za vzniku silanolu a volného radioizotopu, který se v případě ^{18}F může vázat v kostní tkáni. Vazba Si–F proto v molekule musí být chráněna objemnými substituenty, které znesnadní přístup molekuly vody k atomu křemíku. Výsledkem je snížení rychlosti hydrolyzy tak, že již nekonkuruje rozpadu radioizotopu. S objemnými substituenty v podobě *t*Bu apod. však dochází ke zvýšení lipofility výsledného radiofarmaka, což způsobuje zvýšenou afinitu k tukové tkáni.^[6] Tento fakt je překonáván vložím hydrofilní jednotky mezi prostetickou skupinu a biomolekulu v podobě kyseliny asparagové, polyethylenglykolové jednotky či sacharidu. Samotná metoda značení probíhá většinou izotopovou výměnou, kde molekula před značením je chemicky identická s molekulou po značení a není tedy třeba čištění radiofarmaka od neznačené molekuly, viz Obr. 5.^[8] Pro zamezení vzniku nežádoucích vedlejších produktů probíhá reakce v dipolárním aprotickém rozpouštědle za laboratorní či nižší teploty. Zásobní roztok fluoridových aniontů je tedy nutné převést do bezvodého prostředí pomocí iontoměniče, nicméně azeotropická destilace není nutná. Při eluci se kromě kryptandového komplexu používá i kyselina šťavelová, která částečně neutralizuje roztok a zabraňuje tak hydrolyze produktu.^[10,11]



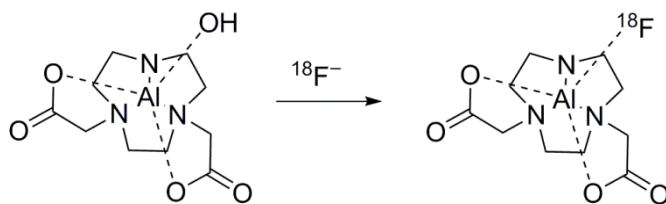
Obr. 5 — Značení biomolekul pomocí křemíku. Izotopová výměna fluoridového aniontu.

Hliník je dalším „fluorofilním“ prvkem, tvoří s fluórem vazby o energii vyšší než 670 kJ/mol. Hliník je na rozdíl od bóru a křemíku typickým kovem, který lze komplexovat ligandy. V poslední době v této oblasti snad nejstudovanější ligandy koordinující hlinité kationty jsou deriváty NOTA respektive triazacyklononanu se třemi acetátovými pendantními rameny. Hlinité ionty tvoří při nízké koncentraci fluoridových aniontů komplex Al^{18}F_x , který je následně chelatován NOTA, viz Obr. 6.^[12,13]



Obr. 6 — Reakce ligandu NOTA s komplexem Al^{18}F_x za vzniku hlinitého komplexu, kde jedno z pendantních ramen NOTA je nahrazeno fluoridovým aniontem.

NOTA je hexadentátní ligand koordinující hlinité kationty třemi dusíkovými atomy cyklu a třemi kyslíkovými atomy pendantních ramen. Z tohoto důvodu dochází částečně k vysycení koordinační sféry hlinitého kationtu ligandem a znesnadnění tak koordinace fluoridového aniontu. Tento poznatek vychází z dosažených radiochemických výtěžků, které byly v případě ligandu NOTA nízké.^[13,14] Proto byly vyvinuty nové příbuzné převážně pentadentátní ligandy, u kterých je tato negativní vlastnost potlačena a s nimi se nabízí i nové metody značení jako je například iontová výměna hydroxidového aniontu (výměna vody) za fluoridový anion v komplexu derivátu NOTA s hlinitým kationtem, Obr. 7.^[15]



Obr. 7 — Hlinitý komplex derivátu ligandu NOTA reaguje s fluoridovým aniontem za vzniku značeného ternárního komplexu.

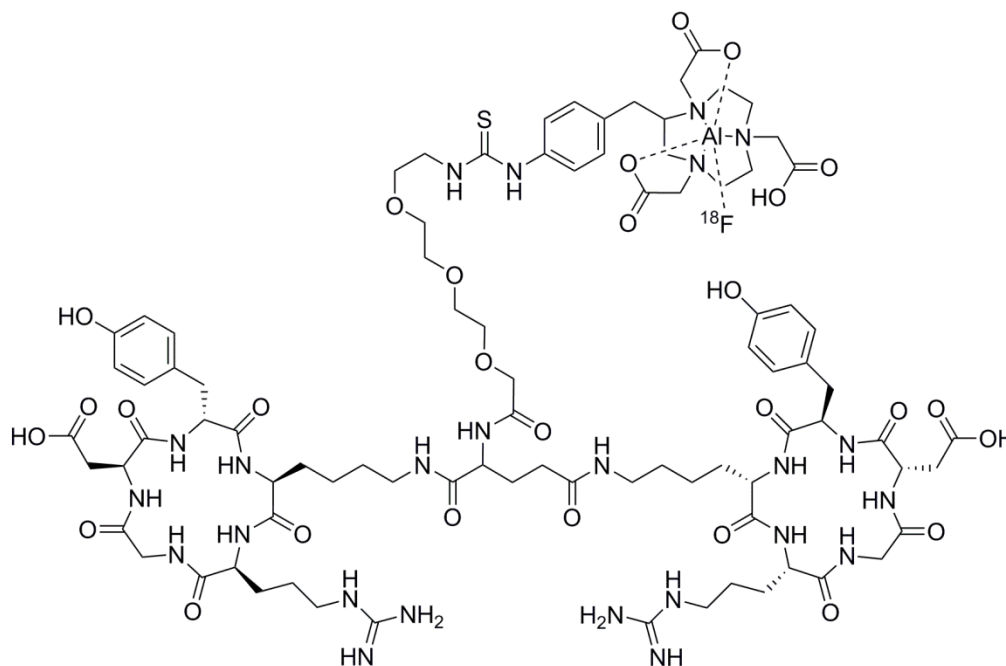
V obou uvedených případech je však limitujícím faktorem vysoká teplota při chelataci a to až 100 °C a zároveň poměrně kyselé prostředí během chelatace, která probíhá v acetátovém pufru při pH 4. Tím je bohužel značení omezeno pouze na takové molekuly, které jsou schopné tolerovat tyto podmínky.

1.2.1. ^{18}F -Alfatide

Je poměrně dobře známo, že pro tvorbu nádoru je nutný proces angiogeneze, respektive proces novotvorby krevních kapilár. Tumor stimuluje okolní tkáň k růstu krevních cév, kterými jsou dopravovány živiny a okysličená krev. V zásadě platí, čím má nádor větší síť krevních kapilár, tím je více zásobován živinami a tím je pravděpodobně agresivnější. Pro regulaci tohoto procesu je důležitá skupina membránových receptorů integrinů, které podporují a udržují proces angiogeneze. Z mnoha jejich typů je to právě integrin $\alpha_v\beta_3$, který hraje nejvýznamnější roli. Tento receptor zprostředkovává interakci endoteliálních buněk s mezibuněčnou hmotou během angiogeneze a zároveň umožňuje migraci nádorových buněk.^[16] Vhodným substrátem pro tento receptor je takzvaný RGD peptid složený z argininu, glycinu a kyseliny asparagové. Označením tohoto peptidu radioaktivním prvkem vzniká kontrastní látka schopná detekovat tumor a jeho velikost, a zároveň lze kontrolovat i odpověď na léčbu.^[17] Při studiích bylo zjištěno, že cyklické RGD peptidy mají vyšší afinitu a jsou selektivnější pro receptor $\alpha_v\beta_3$ ^[18], v řetězci je až 8 peptidových jednotek pro zvýšení afinity k receptoru.^[17] Peptidový řetězec je navázán na jednotku sacharidu či polyethylenglykolu pro zvýšení renální exkrece, zároveň tato jednotka odděluje prostetickou skupinu od substrátu (RGD peptid), ten je tak prakticky samonosný a jeho vazba k receptoru není ovlivněna vazbou k prostetické skupině. Poslední částí radiofarmaka je prostetická skupina, která váže radioizotop. Ten je volen především podle svých fyzikálních vlastností. Pro RGD peptidy je nejvhodnějším radioizotopem ^{18}F , který s poločasem rozpadu 109,8 minut koresponduje s procesem distribuce RGD peptidů k receptorům.^[19] Radiofarmakum ^{18}F -AlF-NOTA-PRGD₂, kde prostetickou skupinou je právě komplex Al-NOTA, bylo nazváno ^{18}F -Alfatide (^{18}F -AlF-NOTA-PEG₄-E[c(RGDyK)]₂), viz Obr. 8.^[7,8,17,18,20–22]

V případě hexadentátní prostetické skupiny NOTA značení ^{18}F probíhá pomocí monofluorokomplexu Al^{18}F , který je následně chelatován ligandem.^[17,21] Nevýhodou však je, že dochází k blokaci fluoridů, jelikož koordinační okolí hlinitého kationtu je plně obsazené ligandem NOTA^[8,17], a proto značení dosahuje pouze nízkých výtěžků 5–25 %.^[17,22] Navíc, značený produkt nelze oddělit od neznačeného komplexu Al-NOTA-PRGD₂, což snižuje specifickou aktivitu, která se pohybuje okolo 0,8 Ci/ μmol .^[17] Při dalších studiích bylo zjištěno, že kyselina glutamová spojující cyklické RGD peptidy podléhá v tomto uspořádání hydrolyze a tudíž tento motiv není vhodný pro použití *in vivo*.^[19] Z následně provedených modifikací struktury chelátu dosahoval nejlepších výsledků model ^{18}F -Alfatide II

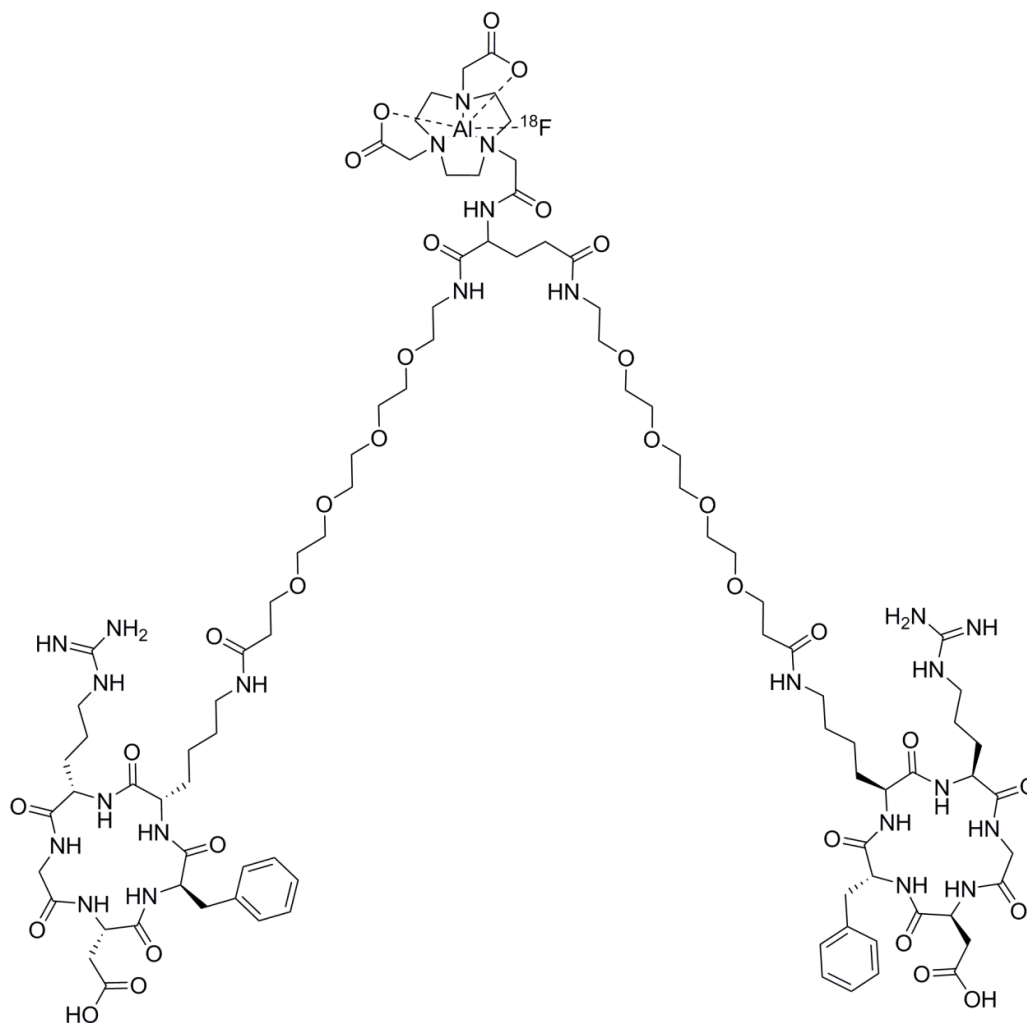
(^{18}F -AlF-NOTA-E[PEG₄-c(RGDfk)]₂), který je velice podobný původní molekule, ale již nemá zmíněné nedostatky, viz Obr. 9.^[23]



Obr. 8 — Strukturní vzorec ^{18}F -Alfatide neboli ^{18}F -AlF-NOTA-PEG₄-E[c(RGDyk)]₂.

Jedno z pendantních ramen je použito k navázání peptidu, čímž toto rameno přestává být koordinující, a tedy poslední koordinační místo je volné pro fluoridový anion. Radiochemický výtěžek takto navržené molekuly byl zvýšen na přibližně dvojnásobnou hodnotu (40–60 %). Specifická aktivita tohoto radiofarmaka se pohybovala od 0,4 do 1 Ci/ μmol , v závislosti na množství reagujícího peptidu a množství zachyceného produktu na 18C koloně, která slouží k odstranění nenavázaného radioaktivního izotopu.^[23–26] ^{18}F -Alfatide II je nyní, spolu s dalšími radiofarmaky obsahující RGD peptidy (^{18}F -Galacto-RGD^[27], ^{68}Ga -RGD^[28], ^{18}F -FPPRGD2^[29]), ve fázi klinického testování a první výsledky detekce metastáz v mozku ukazují na absorpci SUV_{max} Alfatide II v tumoru $1,8 \pm 1,1$ oproti $10,0 \pm 5,7$ pro běžně používanou ^{18}F -FDG. (SUV_{max} neboli „standardized uptake value“ je hodnota běžně používaná v PET praxi, vyjadřuje množství detekované radioaktivity v těle vztažené na aplikovanou dávku radiofarmaka a váhu pacienta, čímž umožňuje srovnání mezi radiofarmaky nezávisle na podmínkách.)^[30] Nižší absorpce Alfatide II je však plně kompenzována velice nízkým pozadím, tumor/pozadí $18,9 \pm 14,1$, na rozdíl od ^{18}F -FDG, kde kontrast tumoru ku pozadí je pouze $1,5 \pm 0,5$.^[19] Detekce tumoru pomocí ^{18}F -FDG je založena na zvýšené absorpci glukózy nádorovými buňkami oproti zdravým buňkám.^[5] Nicméně v mozku dochází k větší spotřebě glukózy fyziologicky, čímž je kontrast vůči postižené tkáni razantně snížen. Nejvyšší absorpce Alfatide II je v ledvinách a močovém měchýři, což poukazuje na renální exkreci. Při testech Alfatide II na zdravých jedincích, všichni pacienti byli bez následků na zdraví. Absorpce radioaktivity v těle na jednu dávku radiofarmaka se

pohybovala hluboko pod stanoveným limitem.^[19] Alfatide II byl testován na detekci tumoru v kostní tkáni, kde dosahoval vyšší citlivosti než již zmíněné radiofarmakum ^{18}F -FDG^[16], což ukazuje na jeho bezpečné použití a možné vícestranné využití.

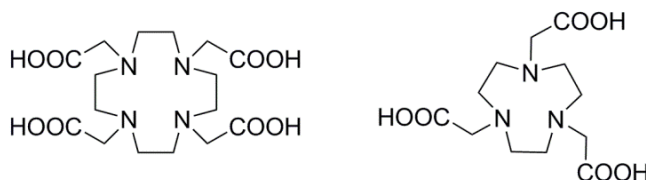


Obr. 9 – Strukturní vzorec ^{18}F -Alfatide II neboli ^{18}F -AlF-NOTA-E[PEG₄-c(RGDfk)]₂.

1.3. ^{68}Ga kontrastní látky

V porovnání s ^{18}F má radioizotop ^{68}Ga všeobecně horší fyzikální vlastnosti pro PET.^[31] Jeho poločas rozpadu je ještě kratší tj. 68 minut, což zvyšuje nároky na rychlou přípravu, energie uvolněných positronů dosahuje hodnot až 1,9 MeV, což snižuje prostorové rozlišení a v neposlední řadě ^{68}Ga se rozkládá β^+ rozpadem pouze z 89 % (oproti 97 % pro ^{18}F). Nicméně přes všechna negativa, velkou výhodou oproti ^{18}F je jeho relativně levná příprava. ^{68}Ga je získáván z generátoru rozpadem ^{68}Ge . 68–Germanium s poločasem rozpadu 280 dní se postupně rozpadá na ^{68}Ga za uvolnění elektronu. ^{68}Ga je eluováno z generátoru roztokem kyseliny chlorovodíkové jako $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$. Gallium je v podobě tetrachloridogallitanového aniontu stabilní v roztoku pouze do pH okolo 3, při vyšším pH dochází k tvorbě

Kontrastní látky značené radioizotopem ^{68}Ga jsou převážně komplexní částice, které mají ve své struktuře zabudovanou reaktivní skupinu pro navázání nosiče (peptid, protein). Gallium je tvrdý kov s poměrně malým poloměrem, jehož koordinační sféra je vysycena zpravidla šesti donorovými atomy. Těmto kritériím se přizpůsobila i struktura ligandů, které jsou převážně hexadentátní a obsahují kyslíkové a dusíkové donorové atomy. Dosud publikované ligandy lze rozdělit na makrocykly a acyklické ligandy. Lineární molekuly se vyznačují všeobecně rychlejší formační kinetikou, nicméně jsou zpravidla málo stabilní.^[33] Gallitý kation je svým poloměrem a afinitou k tvrdým donorovým atomům velice podobný železitému kationtu, který je vázán v krvi hojně zastoupeným proteinem transferrinem. Tento protein, obsahující dvě aktivní místa pro navázání železitého iontu, má tudíž srovnatelnou afinitu ke gallitému kationtu ($\log K_{\text{Ga-transferrin}} = 20,3$) a může tak docházet k transchelataci. A právě i z tohoto důvodu je kladen vysoký důraz na dostatečnou stabilitu ^{68}Ga kontrastních látek *in vivo*.^[32] Tu zaručují především makrocyclické ligandy, kde mezi nejpoužívanější patří deriváty DOTA a NOTA, viz Obr. 10.

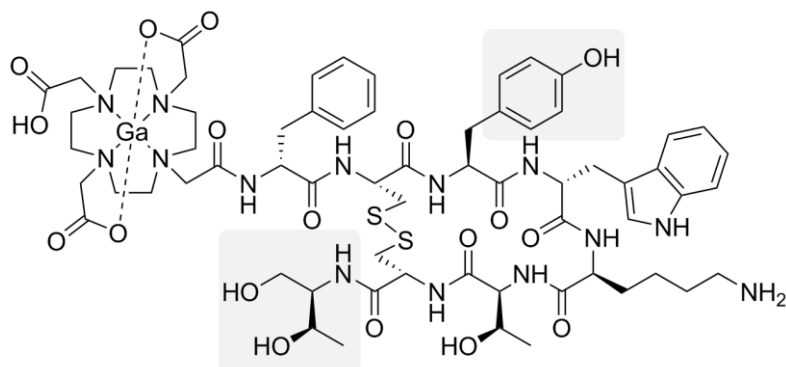


Obr. 10 – Strukturní vzorec ligandů DOTA a NOTA.

Ligand DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina) jako oktaedrátní ligand více než plně obsazuje koordinační sféru gallitého kationtu, nicméně s gallitými kationty tvoří stabilní komplexy ($\log K_{\text{Ga-DOTA}} = 21,3$). Značení těchto látek, komplexace, však často vyžadují vysoké teploty (až 100 °C), což je omezením pro řadu biomolekul.^[33] Významným příkladem ^{68}Ga radiofarmaka již používaným v klinické praxi je $^{68}\text{Ga-DOTA-TOC}$, viz Obr. 11.

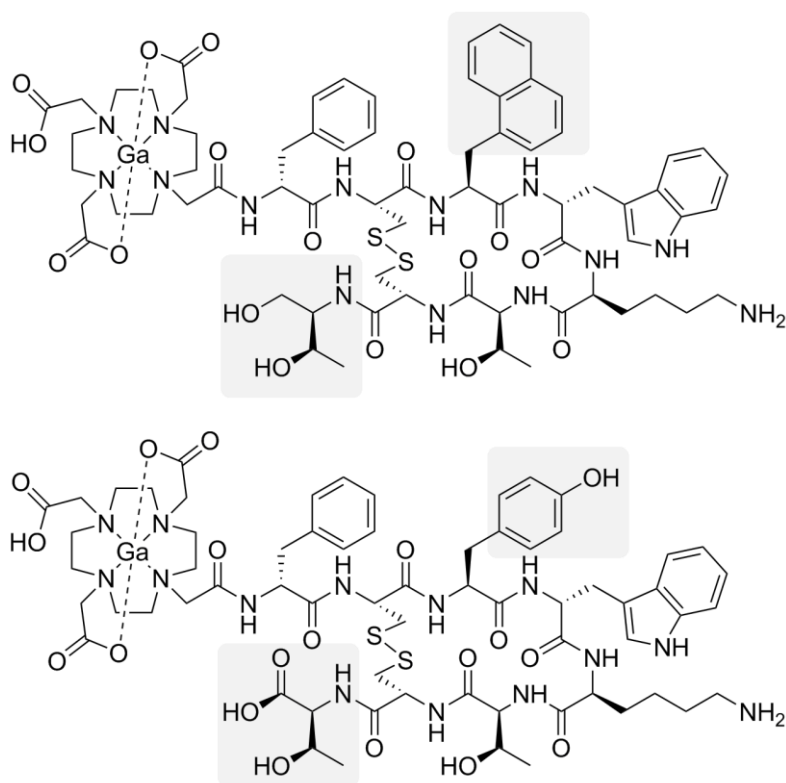
Komplex ^{68}Ga -DOTA-TOC je kontrastní látka obsahující analog peptidu somatostatinu. Somatostatin je neuropeptid, který se podílí mimo jiné na regulaci endokrinní a exokrinní sekrece, ale jeho biologický poločas je příliš krátký, 2–4 minuty. Proto byl navržen příbuzný peptid oktreotid, oktapeptid, který se skládá z menšího počtu aminokyselin, nicméně vazebné místo je totožné s přírodním somatostatinem (Phe-DTrp-Lys-Thr). Jako takový má biologický poločas 90–120 minut, což je v plném

souladu s poločasem rozpadu ^{68}Ga . V lidském těle existuje pět typů receptorů somatostatinu, které jsou hojně zastoupeny v neuroendokrinních tumorech. Oktreotid ^{68}Ga -DOTA-TOC registruje pouze typy 2 a 5 (SSTR₂, SSTR₅), které mají v těle prakticky nulové pozadí, tím dochází k velice selektivní detekci s výborným kontrastem.^[32,34–36]



Obr. 11 – Strukturní vzorec ^{68}Ga -DOTA-TOC.

Na tento úspěch navázal vývoj analogů, jako jsou ^{68}Ga -DOTA-NOC a ^{68}Ga -DOTA-TATE, které se v důsledku odlišné struktury oktreotidu liší afinitou k různým typům receptorů somatostatinu, viz Obr. 12.^[34,37]



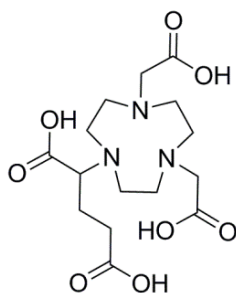
Obr. 12 – Strukturní vzorce kontrastních látek ^{68}Ga -DOTA-NOC (nahore) a ^{68}Ga -DOTA-TATE (dole).

1.3.2. NOTA deriváty

Deriváty makrocyclického ligandu NOTA (1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina) jsou ze strukturního hlediska mnohem vhodnějším chelatantem pro gallitý kation. NOTA je hexadentátní ligand, a proto vhodně vyplňuje koordinační sféru kovu, navíc kavita vytvořená cyklem a pendentními rameny je rozměrově ideální pro malé ionty jako jsou gallité kationty. Proto tyto ligandy vykazují vysokou selektivitu pro gallium a komplexy dosahují vysokých hodnot konstanty stability ($\log K_{\text{Ga-NOTA}} = 30,98$).^[32] Touto prostetickou skupinou bylo značeno mnoho substrátů pro diagnostiku tumorů.^[38–41]

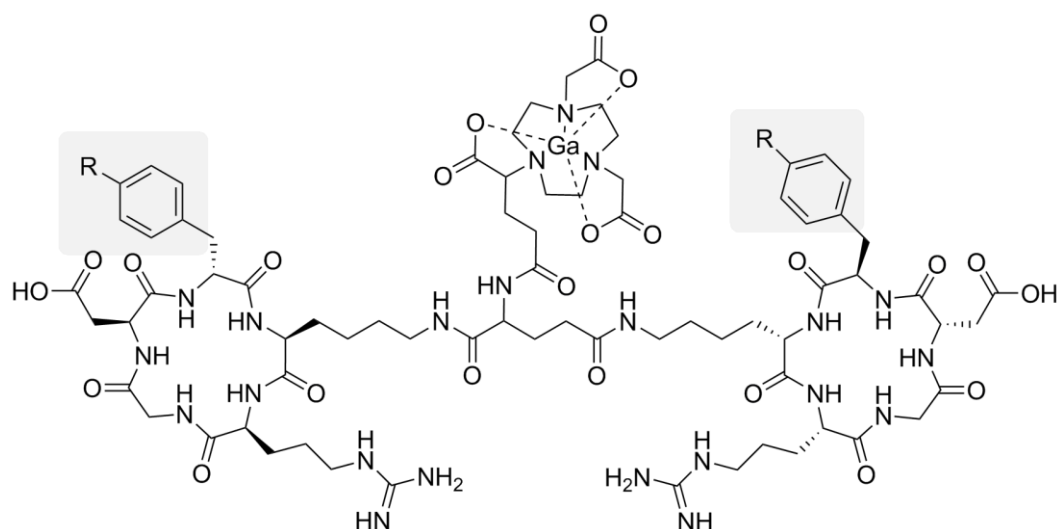
Za zmínku stojí již výše zmíněný RGD peptid. Značená kontrastní látka $^{68}\text{Ga-NOTA-PRGD}_2$ byla studována spolu s prvním modelem $^{18}\text{F-Alfatide}$, kde vykazovala přinejmenším srovnatelné výsledky (specifická aktivita okolo $0,16 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$ a $0,25 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$ pro $^{18}\text{F-AlF-NOTA-PRGD}_2$ a $^{68}\text{Ga-NOTA-PRGD}_2$ v závislosti na množství produktu).^[17,21] V různých strukturních modifikacích, tato látka postoupila do dalších studií^[42–46] včetně klinických testů na pacientech s mozkovou mrtvicí^[28] či s rakovinou plic^[47], kde dosahovala nižší citlivosti, ale vyšší specifity než $^{18}\text{F-FDG}$.

Se stejným cílem, byla dále modifikována i samotná struktura prostetické skupiny a to do podoby ligandu NODAGA. NODAGA je derivát ligandu NOTA, kde na jednom z pendentních ramen je navázán řetězec zakončený reaktivní skupinou pro uchycení nosiče, viz Obr. 13.



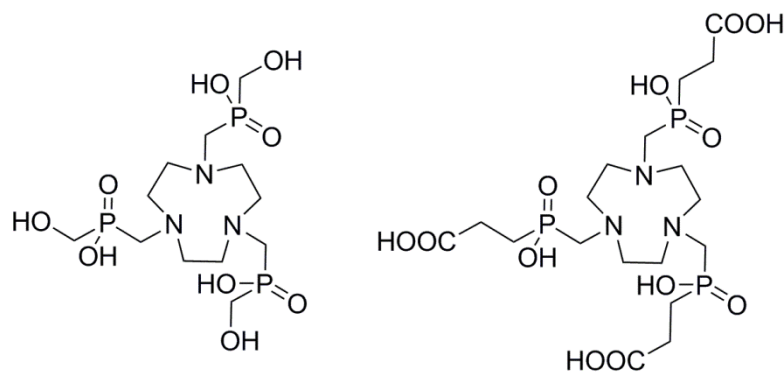
Obr. 13 – Strukturní vzorec NODAGA.

První podoba radiofarmaka obsahovala pouze jeden RGD peptid^[48,49], nicméně následně bylo zjištěno, že dvě jednotky jsou optimem pro zvýšení afinity k receptorům.^[50] Výsledné radiofarmakum $^{68}\text{Ga-NODAGA-E[c(RGDyK)]}_2$ či $^{68}\text{Ga-NODAGA-E[c(RGDfK)]}_2$, viz Obr. 14 (biomolekuly se liší pouze jednou aminokyselinou RGD peptidu, ale afinita obou peptidů k integrinu je srovnatelná), lze značit narozdíl od NOTA za laboratorní teploty s radiochemickým výtěžkem vyšším než 90 % v závislosti na množství reagujícího peptidu.^[50] Specifická aktivita se pohybuje v rozmezí $0,04–0,4 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$. Doposud byly publikovány studie pouze na myších modelech s implantovanými lidskými nádorovými buňkami, nicméně látky byly vstřebávány tumorem, a zároveň dosahovaly vysokého kontrastu.^[50,51]

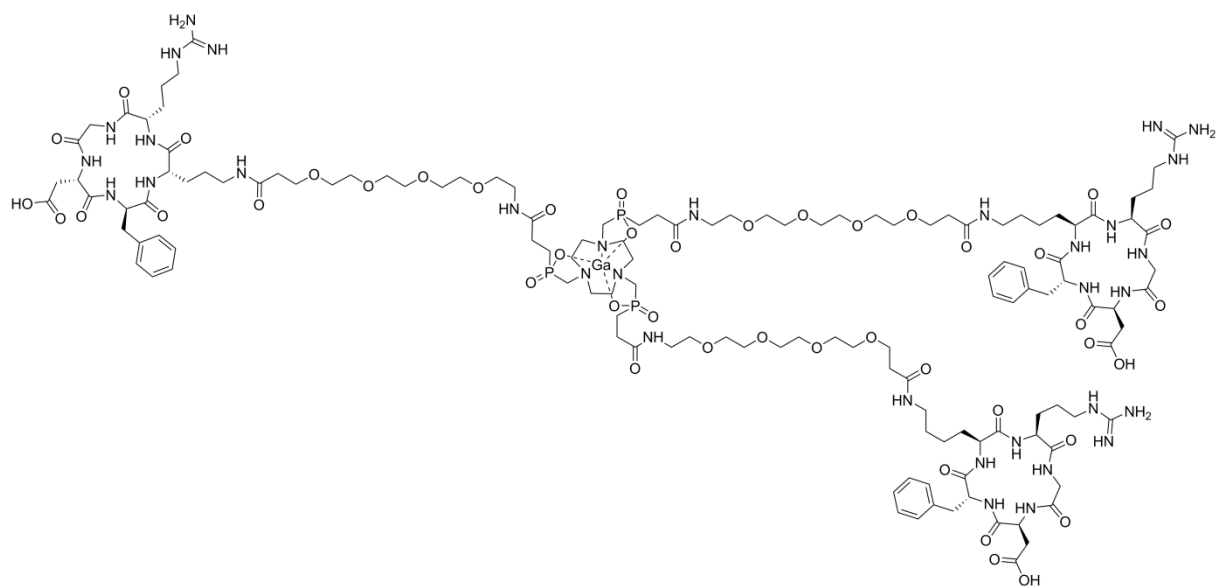


Obr. 14 — Struktura kontrastní látky ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ pro R = OH a ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDfK)]₂ pro R = H.

Na závěr stojí za zmínku neméně významné ligandy umožňující rychlou koordinaci gallitých kationtů za laboratorní teploty, tzv. NOTP^R ligandy (v literatuře známé také pod názvem TRAP^R), viz Obr. 15.^[52] Tyto ligandy v podobě komplexů s gallitými ionty se vyznačují vysokou termodynamickou stabilitou, selektivitou vůči gallitým iontům a zároveň inertností vůči jiným iontům, ale především extrémně vysokou specifickou aktivitou, která se pohybuje až okolo 135 Ci/ μmol .^[53] U nosičů, které tolerují vysokou teplotu (100 °C) navíc dochází k rychlé komplexaci i za tak nízkého pH jako je 0,5, tudíž lze komplexovat gallité ionty již „v surovém stavu“. ^[54] A právě komplex ^{68}Ga -NOTP^{PrA} byl studován jako vhodná prostetická skupina pro RGD peptid. Karboxylové skupiny byly využity ke konjugaci s peptidem, nicméně hexadentátní koordinační sféra zůstala zachována díky koordinujícím fosfinátům. Navíc tak lze vázat až tři RGD peptidy, což zvyšuje afinitu k receptoru. Kontrastní látka ^{68}Ga -NOTP(RGD)₃, viz Obr. 16, vykazovala v preklinických studiích vysokou specifickou aktivitu (108 Ci/ μmol)^[54], hodnoty vstřebávání radiofarmaka v tumoru či afinita k integrinu byly několikanásobně vyšší než v případě ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂.^[55]



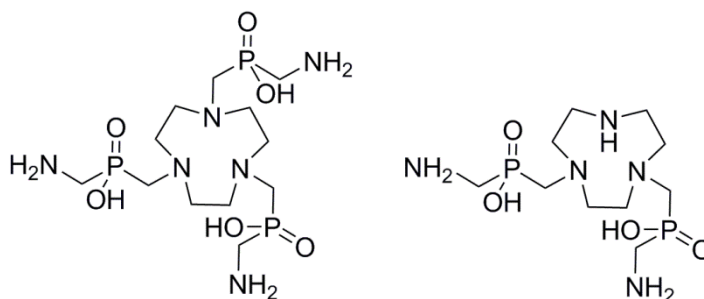
Obr. 15 — Strukturní vzorec ligandu NOTP^{OH} a NOTP^{PrA}.



Obr. 16 — Struktura radiofarmaka ^{68}Ga -NOTP(RGD) $_3$.

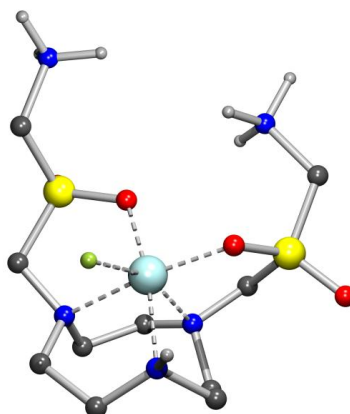
1.4. Cíl práce

Cílem této práce je studium koordinačních vlastností ligandů NOTP^{am} a NODP^{am}, složených z dusíkového cyklu TACN a aminofosfinátových pendatních ramen, viz Obr. 17. Hlinité komplexy těchto ligandů by měly sloužit jako prekurzory kontrastních látek pro ¹⁸F PET, a proto by měla být studována jejich vazba k fluoridovým aniontům. Struktura ligandů byla navržena tak, aby umožňovala co nejrychlejší přípravu kontrastní látky, vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu zářiče, a zároveň aby byla zachována dostatečná stabilita radiofarmaka a inertnost.



Obr. 17 – Strukturní vzorec NOTP^{am}* a NODP^{am}*.

Ligand NODP^{am} obsahuje kyslíkové a dusíkové atomy vhodné pro komplexaci tvrdého kovu jako je hlinitý kation. Struktura však obsahuje pouze dvě pendatní ramena, a je proto pentadentátní, poslední místo v komplexu Al–NODP^{am} by tedy mělo být obsazeno molekulou vody či hydroxidovým iontem v závislosti na pH. Tento ligand by proto měl umožňovat koordinaci fluoridového iontu výměnou za OH[–] (H₂O), viz Obr. 18.



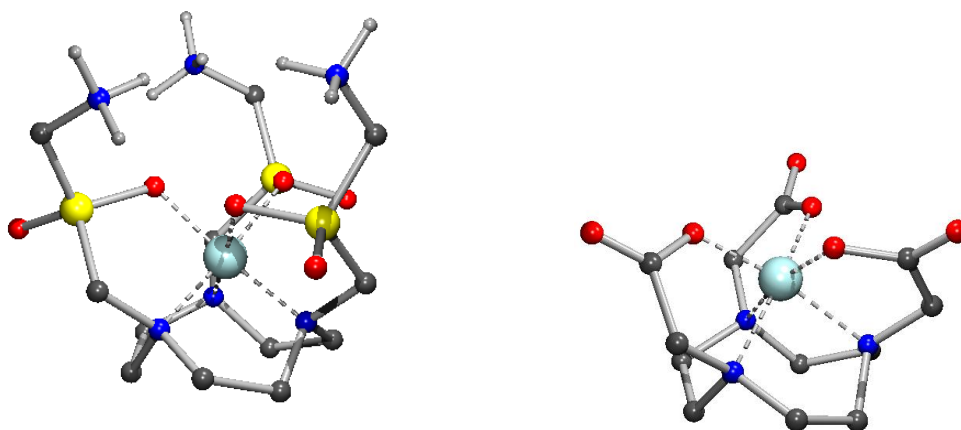
Obr. 18 – Model struktury ternárního komplexu Al–F–NODP^{am} navržený molekulovou mechanikou HyperChem[™] (sv. modrá – hliník, červená – kyslík, žlutá – fosfor, modrá – dusík, tm. šedá – uhlík, sv. šedá – vodík, zelená – fluór). Vodíkové atomy na uhlíku nejsou pro přehlednost struktur znázorněny.

Navíc terminální aminoskupiny na konci pendatních ramen by měly s fluoridovými anionty interagovat prostřednictvím vodíkových vazeb či v protonizovaném stavu pomocí

* Pokud není diskutováno přesné složení částic, není náboj ani protonizační stav ligandů udáván.

elektrostatické interakce. Koncentrace fluoridových iontů v blízkosti hlinitého kationtu by tak měla být značně zvýšená, což by mělo zrychlit koordinaci fluoridů na komplex.

Ligand se třemi pendantními rameny NOTP^{am} byl navržen jako hexadentátní ligand a tudíž by měl zcela vyplňovat koordinační sféru hlinitého iontu stejně jako ligand NOTA zmíněný v teoretickém úvodu, viz Obr. 19.



Obr. 19 – Model struktury hlinitého komplexu Al-NOTP^{am} navržený molekulovou mechanikou HyperChemTM. Vpravo rentgenová struktura komplexu Al-NOTA, převzato z ref. [56] (sv. modrá – hliník, červená – kyslík, žlutá – fosfor, modrá – dusík, tm. šedá – uhlík, sv. šedá – vodík, zelená – fluór). Vodíkové atomy na uhlíku nejsou pro přehlednost struktur znázorněny.

Ligand NOTP^{am} je díky šesti koordinačním místům a rozměru kavity vhodným chelatantem i pro gallitý kation. Přítomné fosfináty by měly umožňovat komplexaci již za velmi nízkého pH, a proto by se tak ligand mohl nabízet jako kontrastní látka pro ⁶⁸Ga PET.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie a metody

Použité chemikálie

Při syntéze byly použity komerčně dostupné chemikálie od firem Lachner, Sigma–Aldrich, Acros, CheMatech. Produkty **1** a **2** byly připraveny dle publikované syntézy.^[57–59] Ligand NOTA byl dříve připraven kolegy v pracovní skupině.

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance

NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian NMR System 300MHz, Varian^{UNITY} INOVA 400, Bruker Avance III 400MHz a Bruker Avance III 600MHz. Měřená jádra a jejich rezonanční frekvence jsou uvedeny v Tab. 2. Vnitřní standardy jsou uvedeny v Tab. 3. Externí standardy jader jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 2 – Měřená jádra a jejich rezonanční frekvence.

jádro	rezonanční frekvence [MHz]			
	VNMRS 300	VINOVA 400	BAIII 400	BAIII 600
¹ H	299,4	–	400,1	600,2
¹³ C	75,4	–	100,6	150,9
³¹ P	121,4	–	162,0	–
²⁷ Al	–	104,2	104,3	–
⁷¹ Ga	–	122,0	122,0	–
¹⁹ F	–	–	376,5	–

Tab. 3 – Vnitřní standardy měřených jader.

jádro	rozpouštědlo	standard	chemický posun [ppm]
¹ H	D ₂ O	<i>t</i> BuOH	1,25
¹³ C	D ₂ O	<i>t</i> BuOH	30,30

Tab. 4 – Externí standardy měřených jader.

jádro	externí standard	chemický posun [ppm]
³¹ P	85% H ₃ PO ₄	0,0
²⁷ Al	0,1M Al(NO ₃) ₃ v 1M NaOH*	80,0
	0,01/0,1M Al(NO ₃) ₃ v 0,1/1M HClO ₄	0,0
⁷¹ Ga	0,1M Ga(NO ₃) ₃ v 1M NaOH*	222,4
¹⁹ F	0,01M NaF	0,0

*zatavený inzert z důvodu absorpce CO₂

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000, vzorky byly ionizovány pomocí ESI (Elektrospray Ionization). Ionty byly analyzovány pomocí IT (Ion Trap). Měřením byla získána spektra záporných i kladných iontů.

Elementární analýza

Elementární analýza byla provedena servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Výsledky jsou uvedeny v charakterizaci ve tvaru: „teoretická hodnota“ („stanovená hodnota“) jako hmotnostní procenta.

Potenciometrické titrace pomocí skleněné elektrody

Titrace byly prováděny v nádobách, termostatovaných na teplotu $25,0 \pm 0,1$ °C, s elektrolytem NMe_4Cl o iontové síle 0,1 M. Potenciál protonů byl měřen kombinovanou elektrodou GK 2401B Radiometer (skleněná elektroda s referentní argentchloridovou elektrodou) připojenou k pH metru 240 PHM Radiometer a bylo titrováno 2 mL automatickou pístovou biretou ABU 900 Radiometer obsahující hydroxid tetramethylamonný. Ostatní roztoky byly pipetovány speciálními pipetami s mikrometrickým šroubem. Roztoky byly měřeny „in-cell“, kde ke změně pH docházelo postupným přidáváním hydroxidu do měřeného roztoku či „out-of-cell“, kde každý bod titrační křivky byl namíchán zvlášť. Celkový objem roztoku měřeného „in-cell“ byl 5 mL, v případě „out-of-cell“ roztoku 1 mL. Jednotlivé koncentrace a objemy přidávaných komponent jsou v Tab. 5 a 6. Inertní atmosféra byla zajištěna mírným proudem argonu nasyceným vodní parou roztoku NMe_4Cl o iontové síle 0,1 M.

Titrace ligandu probíhala „in-cell“. Byly provedeny čtyři paralelní titrace, kde jedna titrace obsahovala 40 bodů.

Titrace kovu a ligandu byly provedeny v poměru 1:1. Jelikož systém s gallitými i s hlinitými ionty dosahoval rovnováhy velice pomalu, probíhala titrace „out-of-cell“. Nejprve však byla provedena „in-cell“ titrace pro získání informace, v jakém rozmezí pH se tvoří nerozpustná fáze. Roztoky byly pipetovány do uzavíratelných baniček, roztoky s vyšším obsahem hydroxidu byly pipetovány do ampulí, které byly zataveny. Pro systém Ga–L byly provedeny čtyři paralelní titrace obsahující 21 bodů. Rovnováha se ustavovala 3 týdny při laboratorní teplotě. V případě systému Al–L byly všechny roztoky pipetovány do ampulí a zataveny. Doba, nutná k dosažení rovnováhy, byla studována pomocí ^{27}Al NMR. U systému Al–NOTP^{am} se rovnováha ustavila po 3 měsících při 72 °C, u systému Al–NOTA byla doba 1 měsíc při 72 °C. Byly provedeny 4 paralelní titrace. Výsledná titrační křivka obsahovala v obou případech pouze 8–10 bodů, z důvodu tvorby nerozpustné fáze v ostatních baničkách.

Protonizační a termodynamické konstanty byly vypočteny v programu OPIUM^[60], který je založen na metodě nejmenších čtverců. Vždy před a po titraci byla provedena kalibrace elektrody titrací kyseliny chlorovodíkové roztokem hydroxidu tetramethylamonného. Z této kalibrační křivky (1) byly odečteny kalibrační parametry (E_0 , S , j_1 , j_2). Při výpočtech bylo uvažováno, že všechny aktivitní koeficienty jsou rovny jedné, tudíž aktivita je rovna koncentraci.

$$E = E_0 + S \log[H^+] + j_1[H^+] + j_2 K_w/[H^+], \quad (1)$$

kde E_0 je standardní potenciál elektrody, S odpovídá směrnici Nernstovy rovnice tj. $RT/zF\{\log(e)\} = 59,159$ mV, hodnoty $j_1[H^+]$ a $j_2[OH^-]$ (platí $K_w = [OH^-] \cdot [H^+]$) odpovídají tzv. kyselé a zásadité chybě. Protonizační konstanty β_n byly vypočteny dle (2):

$$\beta_n = \frac{[H_n L]}{[H]^n [L]}. \quad (2)$$

Konstanta stability β_{hlm} komplexu $H_h L_l M_m$ byla definována jako (3):

$$\beta_{hlm} = \frac{[H_h L_l M_m]}{[H]^h [L]^l [M]^m}. \quad (3)$$

Iontový součin vody pK_w byl 13,81, hodnoty konstant stability M-OH byly použity z ref. ^[61].

Tab. 5 – Koncentrace a objemy jednotlivých složek roztoků při „in-cell“ titraci ligandu.

L		NOTP^{am}		
roztok	HCl v 0,2M NMe₄Cl	L (NOTP^{am})	H₂O	NMe₄OH
c [M]	0,02999	0,02015	–	0,22746
V [mL]	2,506	1,003	1,507	–

Tab. 6 – Koncentrace a objemy jednotlivých složek roztoků při „out-of-cell“ titraci systému kov–ligand.

M–L		Ga–NOTP^{am}			
roztok	HCl v 0,2M NMe₄Cl	L (NOTP^{am})	M (Ga)	H₂O	NMe₄OH
c [M]	0,02999	0,02093	0,04706	–	0,22746
V [mL]	0,501	0,201	0,088	0,211	–
M–L		Al–NOTP^{am}			
roztok	HCl v 0,2M NMe₄Cl	L (NOTP^{am})	M (Al)	H₂O	NMe₄OH
c [M]	0,03318	0,02093	0,05164	–	0,22746
V [mL]	0,501	0,201	0,080	0,221	–
M–L		Al–NOTA			
roztok	HCl v 0,2M NMe₄Cl	L (NOTA)	M (Al)	H₂O	NMe₄OH
c [M]	0,03032	0,02128	0,05164	–	0,22746
V [mL]	0,501	0,200	0,082	0,221	–

Potenciometrické studie pomocí iontově selektivní fluoridové elektrody

Byla sledována koncentrace volných fluoridových iontů fluoridovou iontově selektivní elektrodou (Metrohm, 6.0502.150). Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda s referentním elektrolytem KCl (3 M) a můstkovým elektrolytem NH₄NO₃ (1 M). Obě

elektrody byly připojeny k titrační soustavě Titrand 808 (Metrohm). Roztoky o celkovém objemu 10 ml byly míchány magnetickým míchadlem v polyethylenové nádobě vyhřívané na 25 °C. Závislost potenciálu elektrody na koncentraci volných fluoridových iontů lze popsat rovnicí (4). Při výpočtech bylo uvažováno, že aktivitní koeficienty všech iontů jsou rovny jedné.

$$E_F = E_F^0 - S \log[F^-] + E_j, \quad (4)$$

kde S je směrnice přímky, která odpovídá směrnicí Nernstovy rovnice tj. $RT/zF\{\log(e)\} = 59,159 \text{ mV}$, E_F^0 je parametr elektrody, E_F je měřený potenciál, E_j je kapalinový potenciál a $[F^-]$ je koncentrace volných fluoridů. Parametry S a E_F^0 byly před každým experimentem určeny kalibrací elektrody roztokem 0,1 M NaF v rozmezí koncentrací 0,2–1,0 mM. Celkem byla změřena pětibodová kalibrační křivka.

2.2. Příprava roztoků

Ligandy

Roztoky ligandů NOTA a NOTP^{am} byly připraveny navážením příslušného ligandu, rozpuštěním v H₂O a doplněním po rysku.

Roztoky Al³⁺ a Ga³⁺

Roztoky hlinitých a gallitých iontů byly připraveny navážením příslušných solí Al(NO₃)₃·xH₂O a Ga(NO₃)₃·xH₂O a rozpuštěním v H₂O. Roztok Ga³⁺ byl okyselen HNO₃ na pH 1,8. Roztok gallitých iontů pro **potenciometrické titrace** byl rozpuštěn v 0,02669 M HNO₃. Přesná koncentrace byla zjištěna zpětnou chelatometrickou titrací Chelaton 3.^[62]

Komplexy

Zásobní roztok Al-NOTA byl připraven navážením ligandu NOTA a přidáním ekvivaletního množství roztoku Al(NO₃)₃·xH₂O. Roztok komplexu byl zahříván cca 24 h při 70 °C. Následně bylo pH upraveno na hodnotu 4,5 pomocí NaOH (1 M), kde bylo udržováno přibližně 3 dny při 70 °C. Roztok byl převeden do odměrné baňky a doplněn H₂O po rysku. Přítomnost komplexu byla ověřena pomocí ²⁷Al NMR.

Zásobní roztok Al-NOTP^{am} byl připraven navážením ligandu NOTP^{am}, rozpuštěním v H₂O, okyselením na pH cca 2,5 a přidáním ekvivaletního množství roztoku Al(NO₃)₃·xH₂O. Roztok byl zahříván cca 1 týden při 70 °C, pH bylo udržováno mezi 4,4–4,8 pomocí NaOH (1 M). Roztok byl převeden do odměrné baňky a doplněn H₂O po rysku. Přítomnost komplexu byla ověřena pomocí ²⁷Al NMR.

Zásobní roztok Al-NOTP^{am} pro **studium koordinace fluoridových aniontů** byl připraven navážením ligandu NOTP^{am}, rozpuštěním v H₂O, okyselením na pH cca 2,5 a přidáním 0,5 ekvivalentu roztoku Al(NO₃)₃·xH₂O. Roztok byl zahříván cca 1 týden při 70 °C,

pH bylo udržováno mezi 4,4–4,8 pomocí NaOH (1 M). Roztok byl převeden do odměrné baňky a doplněn H₂O po rysku. Roztok neobsahoval žádné volné hlinité ionty, což bylo dokázáno detekčním činidlem aluminonem.^[63] Přítomnost komplexu byla ověřena pomocí ²⁷Al NMR.

Roztok Ga–NOTP^{am} byl připraven navážením ligandu NOTP^{am}, GaCl₃·xH₂O (18 eq.) a rozpuštěním v H₂O. Roztok byl míchán 24 hodin při laboratorní teplotě, pH roztoku bylo udržováno okolo 3 pomocí LiOH (1 M). Následně bylo pH upraveno na 6 a vzniklá sraženina byla odstraněna filtrací. Produkt byl čištěn na silném katexu (Dowex 50, H₂O → 5 % NH₄OH). Roztok byl zakoncentrován na RVO při 37 °C.

Roztok F⁻

Zásobní roztok fluoridových aniontů byl připraven sušením pevného NaF ve vakuové peci při 110 °C po dobu 5 hodin, následným rozpuštěním navážky v polyethylenové odměrné baňce a doplněním H₂O po rysku.

Pufrační roztoky

Roztoky pufrů byly připraveny rozpuštěním příslušného množství sloučeniny v H₂O a následnou titrací 70 % HClO₄ či 6 M HCl, respektive 5 M NaOH, na pH blízko pufracího maxima sloučeniny. Následně byly roztoky doplněny H₂O po rysku. Použité roztoky jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7 – Pufrační roztoky jejich pH, koncentrace a experiment, ve kterém byly použity.

pufrační roztok	pH	c [M]	experiment
ClCH ₂ COOH/NaOH	2,1; 2,5; 2,7; 2,9; 3,6	1	formace Al–NOTA, Ga–NOTP ^{am}
glycin/NaOH	2,5; 2,9	1	formace Al–NOTP ^{am}
β–alanin/NaOH	3,5	1	formace Al–NOTP ^{am}
1-methylpiperazin/HClO ₄	4,2; 4,5	1	formace Al–NOTP ^{am} , Al–NOTA
	4,4	0,1	koordinace F ⁻
	9,2	0,5	disociace Al–NOTP ^{am} , Al–NOTA
1-methylpiperazin/HCl	4,3	1	koordinace AlF _x
HEPES/NaOH	6,9; 7,9	0,5	disociace Al–NOTP ^{am} , Al–NOTA
CAPS/NaOH	10,2; 10,9	0,125	disociace Al–NOTP ^{am} , Al–NOTA

Roztok NMe₄OH pro potenciometrické titrace

Hydroxid tetramethylamonný byl připraven iontovou výměnou na ionexu Dowex 1 (OH⁻ cyklus) z chloridu tetramethylamonného, který byl před použitím rekrystalizován za horka z isopropanolu. Koncentrace roztoku byla zjištěna titrací hydrogenftalátu draselného.

2.3. Studium vlastností ligandu NOTP^{am}, NOTA a jejich komplexů

Stabilita ligandu NOTP^{am}

Byla provedena stabilitní studie ligandu NOTP^{am} pomocí ³¹P NMR při teplotě 70 °C. Jako externí standard byla použita 85 % H₃PO₄. Studium stability probíhalo v pufrách o pH 2,5; 3,5; 4,5; 1 M NaOH, 1 M HClO₄, 1 M HCl a 0,1 M HCl. Experiment probíhal v NMR kyvetách v termostátované olejové lázni při 70 °C. Spektra byla měřena při 25 °C. Vzorek ligandu v 1 M HCl a 1 M HClO₄ byl studován i při laboratorní teplotě.

Navážka ligandu byla rozpuštěna v 300 µl H₂O a bylo přidáno 300 µl 2 M pufru respektive 2 M (0,2 M) kyseliny či 2 M hydroxidu. Výsledná koncentrace ligandu byla 20 mM.

Formace komplexu Ga–NOTP^{am}

Rychlost formace gallitého komplexu byla studována pomocí ⁷¹Ga NMR spektroskopie, kde jako externí standard byl použit roztok 0,1 M Ga(NO₃)₃ v 1 M NaOH. Formace byla studována v poměru kov:ligand 1:1 při pH 0,0 (1 M HClO₄), 1,0 (0,1 M HClO₄) a v 1 M pufru ClCH₂COOH/NaOH o pH 2,7 při laboratorní teplotě.

Do 5 mm NMR kyvety bylo pipetováno 250 µl 2 M (0,2 M) roztoku kyseliny či pufru, příslušné množství ligandu a gallité soli a roztok byl doplněn H₂O na celkový objem 500 µl. Výsledná koncentrace ligandu a gallité soli v měřeném roztoku byla 10 mM. Po přidání ligandu bylo okamžitě změřeno spektrum, mrtvý čas mezi přípravou a počátkem měření byl cca 2 minuty.

Formace a disociace komplexů Al–NOTA a Al–NOTP^{am}

Formace a disociace hlinitých komplexů byla studována pomocí ²⁷Al NMR spektroskopie při teplotě 70 °C. Formace Al–NOTA byly měřeny v poměru kov:ligand 1:1 v rozmezí pH 2,1–4,2. Formace Al–NOTP^{am} byla studována v poměru kov:ligand 1:1 v rozmezí pH 2,5–4,5. Disociace komplexu Al–NOTP^{am} byla měřena v rozmezí pH 6,9–10,9, disociace komplexu Al–NOTA byla studována pouze při pH 10,2 a 10,9.

Do 5 mm NMR kyvety bylo pipetováno 250 µl 2 M roztoku pufru a k němu bylo pipetováno příslušné množství ligandu a hlinité soli, respektive komplexu. Roztok byl doplněn H₂O na celkový objem 500 µl. Výsledná koncentrace ligandu a hlinité soli, respektive komplexu, v měřeném roztoku byla 10 mM. Jako externí standard byl použit roztok 0,1 M Al(NO₃)₃ v 1 M NaOH (1 M HClO₄). Disociace při vysokých hodnotách pH (10,2 a 10,9) probíhala v 1 cm NMR kyvetách. Bylo pipetováno 1,25 mL 0,2 M pufru a k němu bylo pipetováno příslušné množství komplexu, roztok byl doplněn H₂O na celkový objem 2 mL. Výsledná koncentrace komplexu v roztoku byla 2,5 mM. Kyveta byla vyplněna argonem a byla do ní vložena 5 mm NMR kyveta jako externí standard s roztokem 0,01 M Al(NO₃)₃

v 0,1 M HClO_4 . Obě kyvety (externí standard i 1 cm kyveta) byly uzavřeny víčkem a utěsněny teflonovou páskou.

Roztoky v kyvetách byly zahřívány v termostatované olejové lázni při teplotě 70 °C. NMR měření probíhalo při laboratorní teplotě. Ve všech případech bylo uvažováno, že při laboratorní teplotě formace ani disociace komplexu neprobíhá, což bylo ověřeno experimenty.

Koordinace fluoridových aniontů

Do asi přesně 10 mL pufru (0,1 M 1-methylpiperazin/ HClO_4 ; pH = 4,4) byl pipetován roztok NaF a do roztoku byly ponořeny elektrody. Po ustálení potenciálu byl do roztoku pipetován roztok komplexu Al-NOTA respektive Al-NOTP^{am} a byl změřen potenciál v závislosti na čase. Rozdíl potenciálů v rovnováze roztoku po přidávku fluoridů a po přidávku komplexu byl přepočten na počet koordinovaných fluoridů. Koncentrace komplexu v roztoku byla 0,25 mM, koncentrace F^- byla v rozmezí 0,125–1,250 mM. Následně byl roztok převeden do uzavřené zkumavky a byl zahříván 23 minut při 100 °C v termostatované olejové lázni. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl znovu změřen potenciál roztoku.

Komplexace AlF_x

Komplexace částice AlF_x byla studována pomocí ^{19}F NMR. Relaxační čas byl 10 s, což odpovídá 5-tinásobné hodnotě podélné relaxace T_1 fluoridového aniontu v rozpouštědle $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} = 88:12$.^[64] Experimenty probíhaly v 1 M pufru 1-methylpiperazin/ HCl pH 4,3. Jako vnitřní standard byl použit roztok NH_4PF_6 , který byl do vzorku přidáván na konci experimentu, jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 2,25 mM. Chemický posun ^{19}F NMR spekter byl referencován na 10 mM NaF v H_2O .

Nejprve byla provedena titrace roztoku hlinitých kationtů fluoridovými anionty. Koncentrace $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ byla 10 mM, koncentrace NaF se pohybovala v rozmezí 2,5–100 mM. Následně byl studován systém AlF_x -ligand. Každý vzorek obsahoval tři komponenty ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, NaF, ligand), dvě o koncentraci 10 mM, koncentrace třetí komponenty ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, ligand) byla v rozmezí 2,5–20 mM. V poslední řadě byl studován systém F-NOTP^{am} a to v rozmezí koncentrací NaF 5–40 mM. Koncentrace NOTP^{am} byla 10 mM.

Do polyethylenové vialky bylo pipetováno 200 μL 2 M pufru, příslušné množství $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, NaF a H_2O . Vialka byla uzavřena a utěsněna teflonovou páskou. Roztok byl zahříván při 100 °C 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl do roztoku pipetován ligand. Celkový objem roztoku byl 400 μL . Roztok byl zahříván při 100 °C 15 minut. NMR měření probíhalo v 5 mm kyvetách vybavených PTFE vložkou při 25 °C.

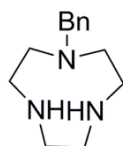
Titrace roztoku hlinitých kationtů byla provedena analogicky, ale experiment byl ukončen po 10 minutách zahřívání s fluoridovými ionty. V případě systému F-NOTP^{am} byl roztok zahříván 15 minut při 100 °C.

Vybrané vzorky byly studovány i pomocí ²⁷Al NMR spektroskopie. Spektra byla referencována na 0,01 M Al(NO₃)₃ v 0,1 M HClO₄.

2.4. Syntéza

1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan (**1**) [58,59]

(produkt byl získán ve formě **1**·3HCl·0,5H₂O)



1

Suspenze TACN (2,00 g; 15,5 mmol) a Me₂NCH(OMe)₂ (2,21 g; 18,5 mmol) v dioxanu (20 mL) byla refluxována 3 h. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl roztok odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v THF (15 mL) a za intenzivního míchání k němu byl velmi pomalu přikapán roztok BnBr (3,44 g; 20,1 mmol) v THF (15 mL). Poté byl do směsi přidán THF (10 mL) a směs byla míchána přes noc při RT. Výsledná sraženina byla odfiltrována, promyta THF (5 mL) a rozpuštěna ve směsi H₂O (10 mL), EtOH (20 mL) a KOH (5,00 g; 89,1 mmol). Vzniklý roztok byl refluxován 3 dny. Roztok byl odpařen na RVO a odparek rozpuštěn v H₂O (40 mL) a extrahován CHCl₃ (3×40 mL). Spojené organické frakce byly odpařeny na RVO, rozpuštěny v roztoku HCl (6 M; 20 mL) a znovu odpařeny. Surový produkt byl rozpuštěn v malém množství iPrOH (10 mL) a k němu byl přikapán Et₂O (15 mL). Stáním v lednici se vyloučily krystaly, které byly odsáty na fritě S3. Opakovanou krystalizací byl získán další podíl. Všechny frakce byly spojeny a dosušeny ve vakuovém exsikátoru nad P₂O₅. Produkt **1**·3HCl·0,5H₂O byl získán ve formě mikrokrystallického prášku (2,90 g; 55 %).

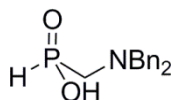
NMR (D₂O, pD < 1): ¹H δ 3,07 (CH₂–N–Bn, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); 3,24 (CH₂–CH₂–N–Bn, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); 3,64 (NH–CH₂–CH₂–NH, s, 4H); 3,94 (CH₂–Ph, s, 2H); 7,50–7,39 (CH–arom., m, 5H); ¹³C δ 42,8 (CH₂–N–Bn, s); 44,2 (CH₂–CH₂–N–Bn, s); 48,3 (NH–CH₂–CH₂–NH, s); 59,8 (CH₂–Ph, s); 129,1 (C–arom., s); 129,6 (C–arom., s); 131,0 (C–arom., s); 135,8 (C–arom., s).

EA (C₁₃H₂₁N₃·3HCl·0,5H₂O, M_R = 337,7): C 46,2 (46,4); H 7,5 (7,4); N 12,4 (12,2); Cl 31,5 (31,5).

MS: (+) 220,5 [M+H]⁺.

Kyselina N,N-dibenzylaminomethylfosfinová (**2**)^[57]

(produkt byl získán ve formě **2**·0,3H₂O)



2

K suspenzi NHBn₂ (5,00 g, 25,0 mmol) a (CH₂O)_n (1,52 g, 50,6 mmol) v EtOH (96 %; 50 mL) byl za stálého míchání při 60 °C přidán vodný roztok H₃PO₂ (50 %; 10,0 g; 76,0 mmol) a směs byla zahřívána 24 h při 60 °C. Po ukončení reakce byl roztok odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v malém množství vody a čištěn na silném katexu (DOWEX 50; H⁺ cyklus; 200 mL; H₂O–EtOH 1:1 → 5 % NH₄OH) a následně silném anexu (Amberlite IRA 402; AcO⁻ cyklus; 200 mL; H₂O → 50 % AcOH). Frakce obsahující produkt byla několikrát odpařena s H₂O. Produkt byl rozpuštěn v horkém Me₂CO (20 mL) a ponechán krystalizovat. Vzniklé krystaly byly odsáty na fritě S3 a dosušeny ve vakuovém exsikátoru nad P₂O₅. Produkt **2**·0,3H₂O byl získán ve formě bílého prášku (5,89 g; 84 %).

NMR (D₂O, pD = 2): ¹H δ 3,18 (CH₂–P, d, 2H, ²J_{HP} = 11 Hz); 4,50 (CH₂–Ph, s, 4H); 6,93 (P–H, d, 1H, ¹J_{HP} = 553 Hz); 7,46–7,56 (CH–arom., m, 10H); ¹³C{¹H} δ 51,6 (CH₂–P, d, ¹J_{CP} = 83 Hz); 59,8 (CH₂–Ph, s); 129,4 (C–arom., s); 130,1 (C–arom., s); 131,0 (C–arom., s); 132,0 (C–arom., s); ³¹P{¹H} δ 10,8 (s); ³¹P δ 10,8 (d, ¹J_{PH} = 553 Hz).

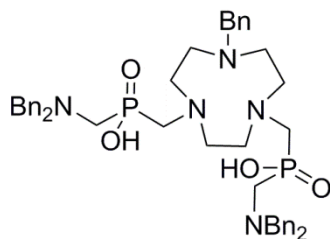
EA (C₁₅H₁₈NO₂P·0,3H₂O, M_R = 280,7): C 64,2 (64,3); H 6,7 (6,3); N 5,0 (5,0).

MS:(+) 298,6 [M+Na]⁺; 573,7 [2M+Na]⁺.

(-) 274,3 [M–H]⁻.

Kyselina 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan-4,7-bis(methyl(N,N-dibenzylamino)methylfosfinová) (**3**)

(produkt byl získán ve formě **3**·4,5H₂O)



3

K roztoku **1**·3HCl·0,5H₂O (0,50 g; 1,48 mmol) a **2**·0,3H₂O (1,88 g; 6,70 mmol) ve vodné HCl (6 M; 25 mL) byl za stálého míchání přidán (CH₂O)_n (171 mg; 5,70 mmol). Reakční směs byla zahřívána 17,5 h při 60 °C. Po ukončení reakce byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a odpařen na RVO. Nažloutlá látka olejovité konzistence byla rozpuštěna v malém množství vody a čištěna na silném katexu (Dowex 50; H⁺ cyklus; 400 mL; H₂O → 1 % pyridin → 20 % pyridin). Frakce 20 % pyridinu byla odpařena na RVO a následně několikrát odpařena s vodou. Olejovitá látka byla rozpuštěna v MeCN (28 mL) a H₂O (112 mL). Roztok byl zmražen v kapalném dusíku a lyofilizován. Produkt **3**·4,5H₂O byl izolován v podobě bílého prášku (0,74 g; 57 %).

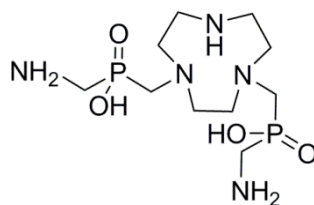
NMR (D₂O pD = 1,4; T = 80 °C): ¹H δ 2,84 (N—CH₂—P—CH₂—N—Bn₂, d, 4H, ²J_{HP} = 6 Hz); 3,17 (P—CH₂—N—Bn₂, d, 4H, ²J_{HP} = 9 Hz); 3,19–3,26 (CH₂—CH₂—N—CH₂—CH₂—N—Bn, CH₂—CH₂—N—Bn, m, 8H); 3,58 (CH₂—CH₂—N—Bn t, 2H, ³J_{HH} = 6 Hz); 4,45 (Ph—CH₂—N, s, 8H); 4,47 (Ph—CH₂—N, s, 2H) 7,44–7,58 (CH—arom., m, 28H); 7,65 (CH—arom., d, 2H, ³J_{HH} = 7 Hz) ¹³C{¹H} δ 51,0 (CH₂—CH₂—N—Bn, s); 51,2 (N—CH₂—P—CH₂—N—Bn₂, d, ¹J_{CP} = 86 Hz); 52,0 (CH₂—CH₂—N—Bn, s); 53,1 (CH₂—CH₂—N—CH₂—CH₂—N—Bn, s); 56,9 (N—CH₂—P—CH₂—N—Bn₂, d, ¹J_{CP} = 103 Hz); 60,2 (Ph—CH₂—N—CH₂—P, s); 62,2 (Ph—CH₂—N—CH₂—CH₂, s); 129,3 (C—arom., s); 129,8–130,1 (C—arom., m); 130,8–131,1 (C—arom., m); 131,8 (C—arom., s); 132,0 (C—arom., s); ³¹P{¹H} δ 21,9 (s).

EA (C₄₅H₅₇N₅O₄P₂·4,5H₂O, M_R = 875,0): C 61,8 (61,6); H 7,6 (7,0); N 8,0 (8,2).

MS:(+) 794,1 [M+H]⁺.

(-) 791,9 [M-H]⁻.

Kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4-bis(methyl(aminomethyl)fosfinová)
(**4**)



4

Do baňky byl odvážen **3**·4,5H₂O (130 mg; 149 μmol) a rozpuštěn v H₂O (7 mL) a 25 % NH₄OH (100 μL). Do roztoku bylo přidáno 10 % Pd/C (39 mg; 37 μmol) a suspenze byla míchána při 60 °C přibližně 10 min. Následně byl navážen NH₄H₂PO₂ (407 mg; 4,9 mmol) a rozpuštěn ve H₂O (4 mL). Roztok NH₄H₂PO₂ byl kanylou přes septum za stálého míchání přidáván do reakční směsi pomocí lineární pumpy (rychlost 300 μL/h, 10 mL injekční

stříkačka o průměru 17,75 mm, přidaný objem 4 mL) při 60 °C. Po 28,5 h byla směs ponechána vychladnout na RT a pevné složky byly odfiltrovány na fritě S4 a několikrát promyty H₂O (2 mL). Filtrát byl odpařen na RVO a dále opakovaně odpařen s H₂O. Surový produkt byl čištěn na slabém katexu (Amberlite IRA CG50, 30 mL, H₂O → 5 % pyridin → 10 % pyridin → 20 % pyridin). Frakce 20 % pyridinu obsahující čistý produkt byly spojeny a několikrát odpařeny s H₂O. Produkt **4** byl získán ve formě olejovité látky s čistotou >90 % dle ³¹P NMR (16 mg; přepočteno na 90 % čistotu odpovídá výtěžku 29 %).

NMR (D₂O, pD = 3,6): ¹H δ 3,09 (CH₂–CH₂–N–CH₂–CH₂–NH, s, 4H); 3,13 (P–CH₂–NH₂, d, 4H, ²J_{HP} = 9 Hz); 3,19 (N–CH₂–P–CH₂–NH₂, d, 4H, ²J_{HP} = 6 Hz); 3,26 (CH₂–CH₂–NH, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); 3,38 (CH₂–CH₂–NH, t, 4H, ³J_{HH} = 6 Hz); ¹³C{¹H} δ 38,2 (P–CH₂–NH₂, d, ¹J_{CP} = 90 Hz); 44,3 (CH₂–CH₂–NH, s); 50,6 (CH₂–CH₂–NH, d, ³J_{CP} = 3 Hz); 53,3 (CH₂–CH₂–N–CH₂–CH₂–NH, d, ³J_{CP} = 6 Hz); 55,8 (N–CH₂–P–CH₂–NH₂, d, ¹J_{CP} = 105 Hz); ³¹P{¹H} δ 26,0 (s).

MS: (+) 343,7 [M+H]⁺.

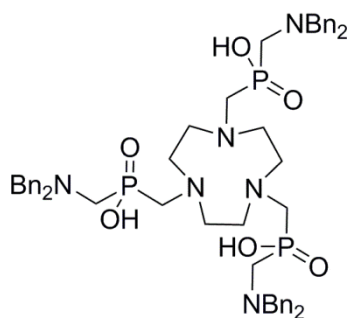
(–) 341,8 [M–H][–].

Kyselina 1,4,7–

triazacyklononan–1,4,7–tris(methyl(N,N–dibenzylaminomethyl)fosfinová)

(5)

(produkt byl získán ve formě **5**·3H₂O)



5

K roztoku TACN (100 mg; 770 μmol) a **2**·0,3H₂O (790 mg; 2,81 mmol) v HCl (6 M; 10 mL) byl za stálého míchání přidán (CH₂O)_n (103 mg; 3,43 mmol). Reakční směs byla zahřívána 18 h při 40 °C. Následně byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a odpařen na RVO. Olejovitá látka byla rozpuštěna v H₂O (50 mL) a 25 % NH₄OH (10 mL) a extrahována CH₂Cl₂ (50 mL). Organická fáze byla oddělena, zfiltrována s aktivním uhlím a odpařena na RVO. Oparek byl rozpuštěn v malém množství H₂O (4 mL) a MeOH (4 mL) a byl čištěn na silném katexu (Dowex 50; H⁺ cyklus; 130 mL; H₂O → 1 % pyridin → 20 % pyridin). Frakce

20 % pyridinu byla odpařena na RVO a následně několikrát odpařena s vodou. Olejovitá látka byla rozpuštěna v MeCN (30 mL) a H₂O (100 mL). Roztok byl zmražen v kapalném dusíku a lyofilizován. Produkt **5**·3H₂O byl izolován v podobě bílého prášku (680 mg; 84 %).

NMR (D₂O, pD = 1,9): ¹H δ 2,98 (N—CH₂—P—CH₂—N—Bn₂, d, 6H, ²J_{HP} = 7 Hz); 3,18 (P—CH₂—N—Bn₂, d, 6H, ²J_{HP} = 9 Hz); 3,30 (CH₂—cyklus, s, 12H); 4,41 (CH₂—Ph, s, 12H); 7,45–7,54 (CH—arom., m, 30H); ¹³C{¹H} δ 50,8 (P—CH₂—N—Bn, d, ¹J_{CP} = 87 Hz); 52,9 (CH₂—cyklus, s); 57,0 (N—CH₂—P—CH₂—N—Bn₂, d, ¹J_{CP} = 101 Hz); 59,9 (CH₂—Ph, s); 129,3 (C—arom., s); 130,1 (C—arom., s); 131,1 (C—arom., s); 132,1 (C—arom., s); ³¹P δ 20,7 (s).

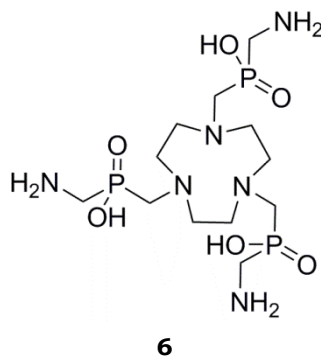
EA (C₅₄H₆₉N₆O₆P₃·3H₂O, M_R = 1045,1): C 62,1 (61,8); H 7,2 (7,0); N 8,0 (8,0).

MS:(+) 991,1 [M+H]⁺; 1013,0 [M+Na]⁺; 1035,1 [M+2Na-H]⁺.

(-) 989,0 [M-H]⁻.

Kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-tris(methyl(aminomethyl)fosfinová) **(6)**

(produkt byl získán ve formě **6**·2,5H₂O)



Do 250 mL baňky byl odvážen **5**·3H₂O (691 mg; 661 μmol), který byl rozpuštěn v H₂O (70 ml) a NH₄OH (25 %, 0,65 ml). Do roztoku byl přidán NH₄H₂PO₂ (1,74 g; 21,0 mmol) a 10 % Pd/C (207 mg; 195 μmol) a směs byla míchána 22 h při 60 °C. Po ochlazení na RT, byly pevné složky odfiltrovány na fritě S4 a několikrát promyty H₂O (5 mL). Filtrát byl odpařen na RVO, rozpuštěn v H₂O a znovu odpařen na RVO. Surový produkt byl dále čištěn iontovou chromatografií na silném katexu (Dowex 50, 100 ml, H₂O → 1 % pyridin → 20 % pyridin). Frakce 20 % pyridinu obsahující čistý produkt byly spojeny a odpařeny na RVO. Odparek byl několikrát rozpuštěn v H₂O (10 ml) a znovu odpařen. Olejovitá látka byla rozpuštěna v H₂O (40 ml), zmrazena v kapalném dusíku a následně lyofilizována. Produkt **6**·2,5H₂O byl získán ve formě bílého prášku (182 mg; 56 %).

NMR (D₂O, pD = 1,6): ¹H δ 3,24 (P-CH₂-NH₂, d, 6H, ²J_{HP} = 10 Hz); 3,46 (N-CH₂-P-CH₂-NH₂, d, 6H, ²J_{HP} = 7 Hz); 3,59 (CH₂-cyklus, s, 12H); ¹³C{¹H} δ 38,5 (P-CH₂-NH₂, d, ¹J_{CP} = 96 Hz); 52,8 (CH₂-cyklus, s); 56,1 (N-CH₂-P-CH₂-NH₂, d, ¹J_{CP} = 98 Hz); ³¹P{¹H} δ 23,3 (s).

EA (C₁₂H₃₃N₆O₆P₃·2,5H₂O, M_R = 495,4): C 29,1 (29,2); H 7,7 (7,3); N 17,0 (16,8).

MS: (+) 450,9 [M+H]⁺; 488,9 [M+K]⁺.

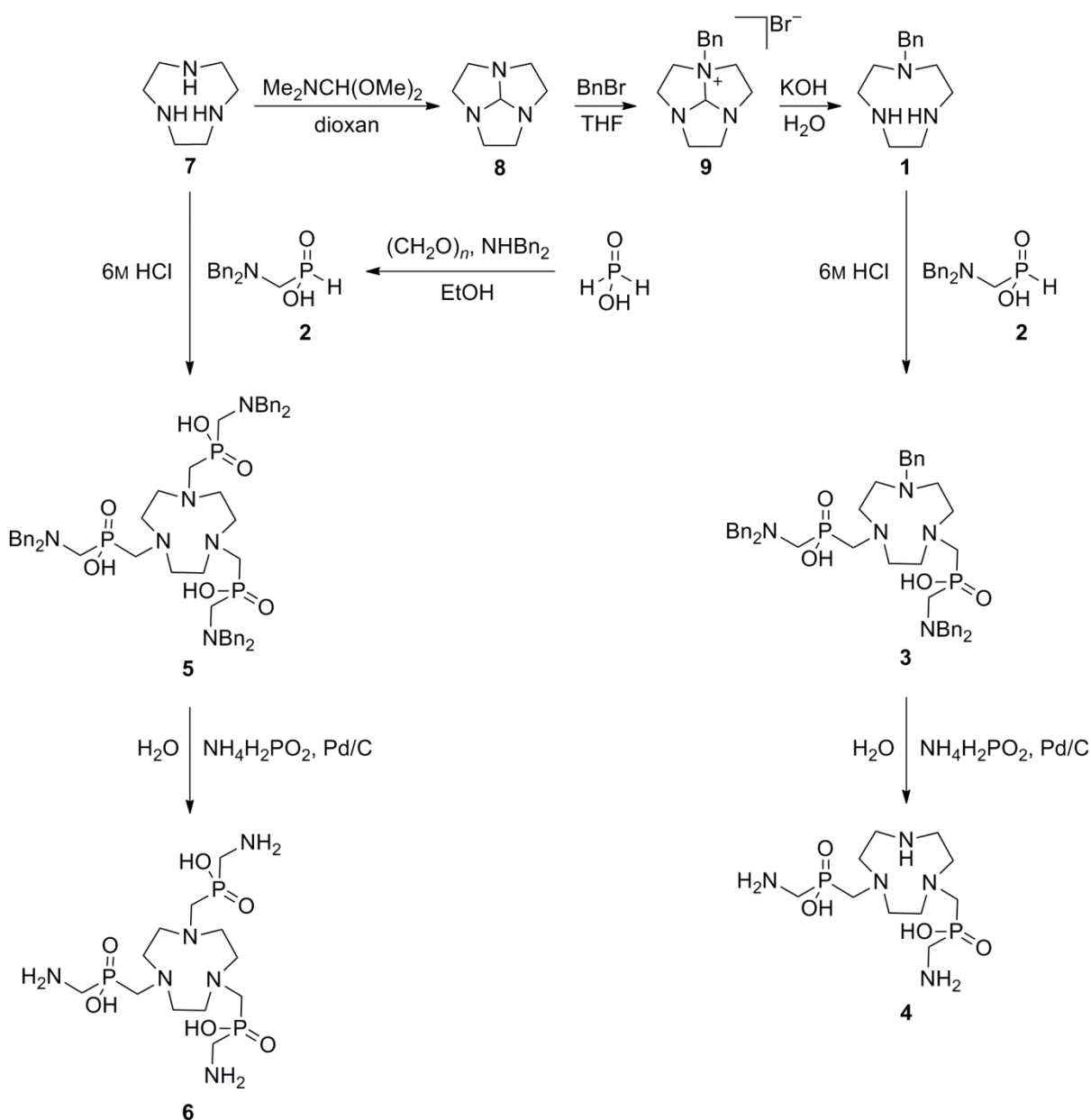
(-) 448,7 [M-H]⁻.

3. Výsledky a diskuze

3.1. Příprava ligandů NODP^{am} a NOTP^{am}

Syntéza ligandů byla rozsáhle diskutována již v bakalářské práci^[65], a proto zde bude stručně shrnuta jejich příprava a diskutovány budou pouze nové poznatky.

Primárními reakcemi syntézy obou ligandů byla příprava prekurzorů, kde některé aminové skupiny musely být chráněny benzylovou skupinou, viz Obr. 20. Kyselina dibenzylaminomethylfosfinová **2** byla připravena reakcí Mannichova typu, kde kyselina fosforná reaguje s dibenzylaminem a paraformaldehydem. Výchozí látka **1** byla připravena můstkovým chráněním triazacyklononanu **8** za vzniku kvarterní soli **9** a následnou hydrolyzou můstku. Syntézy byly provedeny dle ref. ^[57–59].



Obr. 20 — Schéma přípravy ligandů NODP^{am} **4** a NOTP^{am} **6**.

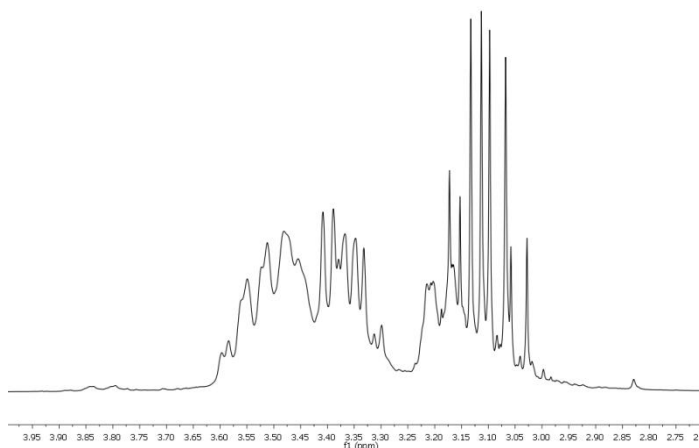
Příprava meziproduktů **3** a **5** spočívá v reakci Mannichova typu, která dle ^{31}P NMR dosahuje 100 % konverze. Výsledná reakční směs obsahuje produkt a kyselinu dibenzylaminomethylfosfinovou, která reaguje v nadbytku. Fosfinová kyselina je odstraněna na silném kationtovém iontoměniči elucí 1 % pyridinem, zatímco produkt je eluován 20 % pyridinem. Výtěžek benzylovaného meziproduktu **3** dosahuje nižších hodnot (57 %), pravděpodobně z důvodu částečné eluce produktu již 1 % pyridinem. V případě meziproduktu **5**, je část fosfinové kyseliny odstraněna již extrakcí. Produkt krystalizuje v podobě amonné soli. Krystalizací však bylo dosaženo výtěžku maximálně 62 %, vyššího výtěžku je pak dosaženo odstraněním fosfinové kyseliny na iontoměniči (84 %).

Posledním krokem syntézy je odštěpení chránících skupin, které bylo provedeno pomocí hydrogenace. V bakalářské práci^[65] je uvedena hydrogenace ve vodném prostředí na palladiu s mravenčanem amonným jako zdrojem vodíku. Tuto reakci se však nepodařilo plně reprodukovat pravděpodobně z důvodu rozkladu produktu, viz níže. Proto byly hledány nové reakční podmínky (teplota, tlak, rozpouštědlo, poměr reaktantů) včetně jiného zdroje vodíku (balónek H_2 , kontinuální probublávání H_2 , cyklohexadien). Úspěšná debenzylace proběhla s fosforanem amonným, kde dle ^1H NMR nebyly v reakční směsi žádné benzylové meziprodukty. Po odstranění přebytku fosforanu však bylo zjištěno, že v reakční směsi jsou další produkty. Přesto ligand **6** byl úspěšně izolován iontovou chromatografií na silném katexu s výtěžkem téměř 60 %. Ligand **4** však nebylo možné získat jinak než iontovou chromatografií na slabém katexu a to v čistotě > 90 %, ale výtěžku pouze 30 %. Tato reakce proto byla monitorována pomocí MS. Fosforan amonný musel být do reakční směsi přidáván velice pomalu, jinak docházelo k otravě katalyzátoru, proto byla použita lineární pumpa. Dle této metody bylo zjištěno, že molekula se rozkládá, ještě než dojde k odštěpení všech benzylových skupin. Rozkladné produkty odpovídají štěpení $\text{N}-\text{C}-\text{P}$ vazeb. Z tohoto důvodu a především pro obtížnou purifikaci by bylo vhodnější zvolit chránění aminových skupin vyžadující mírnější podmínky při štěpení chránících skupin jako např. ftalimidy. Tento krok by však vyžadoval nové hledání reakčních podmínek pro reakci Mannichova typu, jelikož ftalimidy jsou labilní v silně kyselém prostředí, či úplně novou strategii přípravy. Analogická reakce byla provedena s meziproduktem **5**, tzn. roztok fosforanu amonného byl do reakční směsi přidáván lineární pumpou, ale bylo zvoleno 20 ekvivalentů $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ oproti 30 ekvivalentům pro ligand **3**. Terminální aminoskupiny jsou totiž hydrogenovány snadněji, což bylo dokázáno při sledování hydrogenace ligandu **3** pomocí MS, kde reakční doba byla prodloužena na 29 h pravděpodobně právě kvůli pomalé hydrogenaci benzylové skupiny vázané na cyklus. Měření ukázalo, že kvantitativní hydrogenace meziproduktu **5** trvá pouze 6 hodin.

3.2. Příprava komplexu Ga–NOTP^{am}

Komplex Ga–NOTP^{am} byl připraven reakcí ligandu NOTP^{am} s nadbytkem gallitých iontů. Volné gallité ionty byly odstraněny vysrážením ve formě hydroxidu gallitého.

Komplexací gallitého iontu dochází ke změně prostorového uspořádání ligandu: dusíkový cyklus zaujímá dvě možné konformace $\delta\delta\delta$ či $\lambda\lambda\lambda$ a pendantní ramena jsou stočena okolo iontu a to ve dvou možných směrech Λ a Δ . Proto se molekula komplexací stává chirální a může mít podobu až čtyřech diastereoizomerních párů. Dle ^{31}P NMR vzniká v případě Ga–NOTP^{am} majoritně jeden signál, což odpovídá magneticky ekvivalentním fosfinátovým skupinám, což splňují pouze dva diastereoizomerní páry $\Lambda\delta\delta\delta$ –RRR/ $\Delta\lambda\lambda\lambda$ –SSS a $\Lambda\delta\delta\delta$ –SSS/ $\Delta\lambda\lambda\lambda$ –RRR. Další efekt komplexace je pozorovatelný na ^1H NMR spektru, viz Obr. 21, které je v porovnání se spektrem ligandu mnohem složitější. Atomy vodíku skupiny CH_2 přestávají být v důsledku koordinace chemicky ekvivalentní. Dochází tak k mnoha J -interakcím v oblasti alifatických vodíků, což způsobí nepřehlednost spektra. Vysoká symetrie komplexu je však evidentní z ^{13}C NMR spektra, ve kterém jsou pouze 4 signály. Dva dublety odpovídají CH_2 skupinám na pendantních ramenech a dva signály cyklových CH_2 skupin. V důsledku konformace makrocyclu interaguje jeden z uhlíků cyklové jednotky CH_2 – CH_2 nepřímou spin-spinovou interakcí s atomem fosforu a ve spektru je tento signál zaznamenán jako dublet.



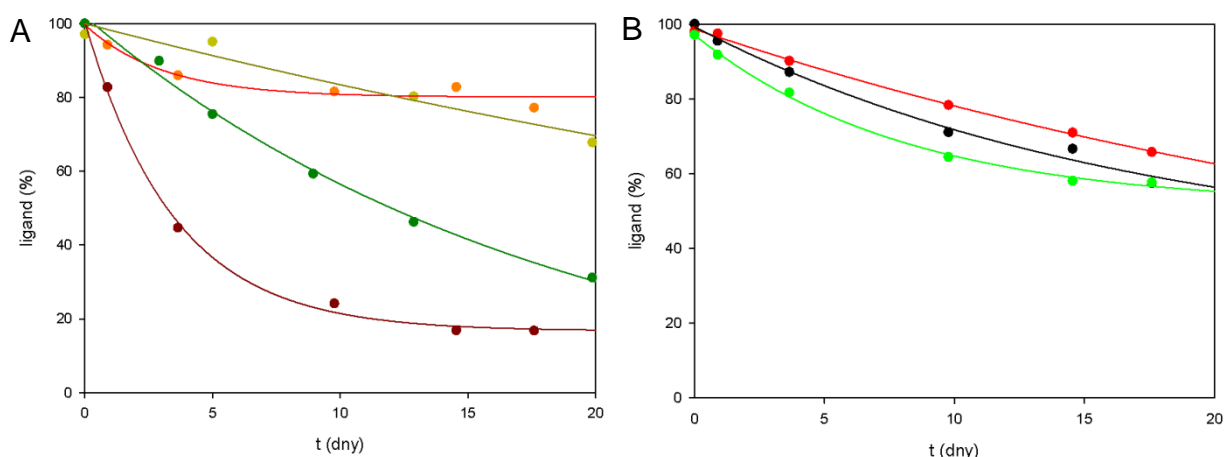
Obr. 21 – ^1H NMR spektrum komplexu Ga–NOTP^{am}.

3.3. Stabilita ligandu NOTP^{am}

Při studiích koordinačních vlastností ligandu NOTP^{am} s hlinitými ionty byla získána data poukazující na nízkou stabilitu komplexu Al–NOTP^{am}. Tyto výsledky vedly k otázce, zda je samotný ligand stabilní při experimentálních podmínkách.

Stabilita ligandu byla testována při 70 °C v kyselém i bazickém prostředí a pufovaných roztocích, ve kterých probíhala formace komplexu Al–NOTP^{am}, viz níže. Ligand je poměrně stabilní v bazickém prostředí, ale při nízkém pH dochází k jeho rozpadu. Dle Obr. 22 rychlost rozpadu klesá se zvyšujícím se pH a i při pH = 0 probíhá v řádu několika dní až týdnů. Vyskytují-li se v roztoku chloristanové anionty, dochází k urychlení rozkladu ligandu. Tento efekt je pravděpodobně způsoben oxidačními účinky kyseliny chloristé.

Děj je velmi závislý na teplotě. V 1 M HCl a 1 M HClO₄ nebyl pozorován rozklad ligandu při laboratorní teplotě po dobu minimálně dvou měsíců.



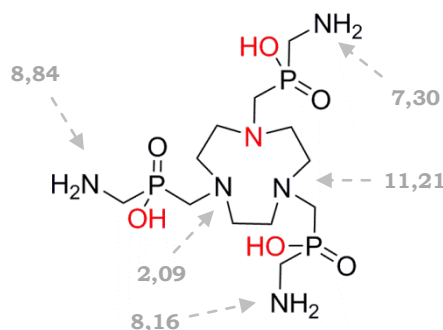
Obr. 22 — Stabilita ligandu NOTP^{am} dle ³¹P NMR při 70 °C. (A: ● – 0,1 M HCl; ● – 1 M NaOH; ● – 1 M HCl; ● – 1 M HClO₄; B: ● – 1 M β-Alanin/NaOH pH 3,5; ● – 1 M Glycin/NaOH pH 2,5; ● – 1 M 1-methylpiperazin/HClO₄ pH 4,5).

3.4. Acidobazické vlastnosti

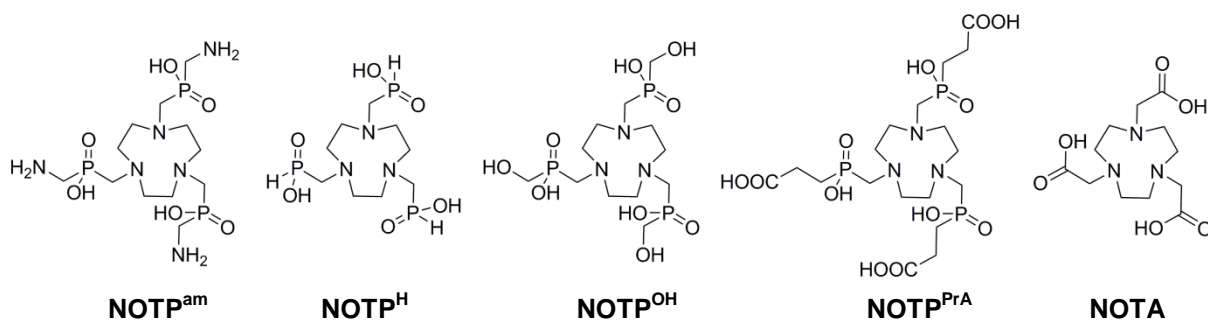
Ligand NOTP^{am} byl titrován v rozsahu pH 1,5–12,0. Byly stanoveny protonizační konstanty, které lze přiřadit jednotlivým protonizovatelným funkčním skupinám ligandu NOTP^{am}, viz Obr. 23. První protonizační konstanta s hodnotou 11,21 náleží cyklovému atomu dusíku a určuje tak celkovou bazicitu ligandu. Následné konstanty 8,84, 8,16 a 7,30 přísluší terminálním aminoskupinám na konci pendantních ramen a poslední stanovená protonizační konstanta 2,09 patří druhému cyklovému atomu dusíku. Další konstanty nebyly vypočteny, jelikož dosahují příliš nízkých hodnot.

Srovnáme-li protonizační konstanty ligandu NOTP^{am} se strukturně podobnými ligandy, viz Obr. 24, a ligandem NOTA, vidíme, že jsou silně ovlivněny přítomností pendantních ramen, viz Tab. 8. Ligandy s fosfinátovými pendantními rameny mají oproti ligandu NOTA s acetátovými pendantními rameny nižší první protonizační konstantu. To je

v důsledku snížení elektronové hustoty na atomu dusíku vlivem fosfinátových skupin. Ze stejného důvodu jsou hodnoty protonizačních konstant acetátových skupin $\log K_3$ a $\log K_4$ ligandu NOTA vyšší než hodnota $\log K_3$ ligandu NOTP^{OH} či $\log K_6$ ligandu NOTP^{PrA} odpovídající fosfinátovým skupinám. Konstanta $\log K_5$ ligandu NOTP^{am} náležící druhému cyklovému atomu dusíku je mnohem nižší než u ostatních fosfinátových ligandů včetně ligandu NOTA ($\log K_2$), důvodem je přítomnost terminálních aminoskupin, které v protonizovaném stavu značně odtahují elektronovou hustotu.



Obr. 23 — Protonizační konstanty přiřazené jednotlivým funkčním skupinám ligandu NOTP^{am}. Červeně jsou vyznačeny funkční skupiny, které mají příliš nízké hodnoty protonizačních konstant, a které tak nemohly být stanoveny potenciometrickou titrací.

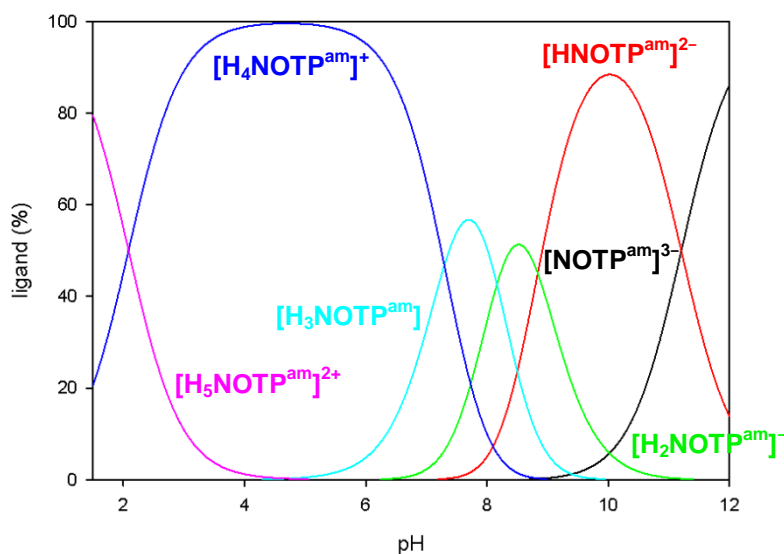


Obr. 24 — Strukturní vzorce diskutovaných ligandů.

Tab. 8 — Celkové protonizační konstanty ligandu NOTP^{am} ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{M}$) a konsektivní protonizační konstanty diskutovaných ligandů.

$\log \beta_{hi}$	NOTP ^{am}	$\log K$	NOTP ^{am}	NOTP ^H [52]	NOTP ^{OH} [52]	NOTP ^{PrA} [52]	NOTA ^[66]
$\log \beta_{11}$	11,21 (1)	$\log K_1$	11,21	10,48	11,47	11,48	13,17
$\log \beta_{21}$	20,04 (2)	$\log K_2$	8,84	3,28	3,85	5,44	5,74
$\log \beta_{31}$	28,20 (1)	$\log K_3$	8,16	—	1,30	4,84	3,22
$\log \beta_{41}$	35,50 (1)	$\log K_4$	7,30	—	—	4,23	1,96
$\log \beta_{51}$	37,59 (2)	$\log K_5$	2,09	—	—	3,45	—
—	—	$\log K_6$	—	—	—	1,66	—

Na Obr. 25 je distribuční diagram ligandu. Bylo popsáno celkem 6 částic v různém stupni protonizace. Při pH 1,5–4 se v roztoku nachází pětikrát protonizovaná částice, která postupně přechází na čtyřikrát protonizovanou. Ta má při pH = 5 100 % zastoupení. Následně dochází ke třem poměrně rychle po sobě jdoucím deprotonizacím. Plně deprotonizovaná forma ligandu vzniká při pH = 9–12.



Obr. 25 – Distribuční diagram ligandu NOTPam ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$, $c = 4\text{ mM}$).

3.5. Stabilita komplexů

Systém Ga–NOTPam

Titrací systému Ga–NOTPam byla zjištěna celková konstanta stability, která dosahovala hodnoty $\log\beta = 25,31$, viz Tab. 9, což se shoduje s vlastnostmi pozorovanými u trisubstituovaných fosfinátových ligandů.^[52] Z naměřených dat byly vypočteny protonizační konstanty příslušející terminálním aminoskupinám na pendantních ramenech, viz Tab. 10. V porovnání s konstantami nalezenými při titraci samotného ligandu klesla jejich hodnota v důsledku komplexace přibližně o dva řády.

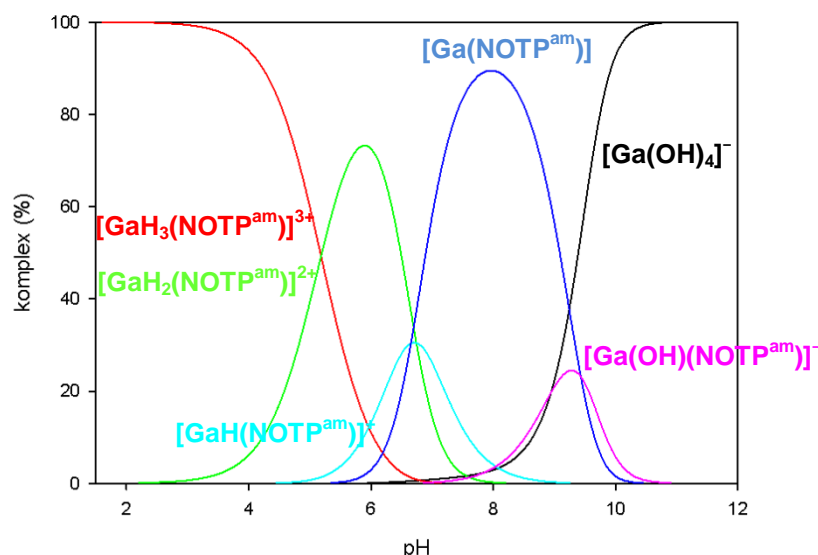
Tab. 9 – Konstanty stability $\log\beta$ komplexu Ga–NOTPam ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$).

částice	$\log\beta(\text{Ga–NOTPam})$
$[\text{Ga}(\text{L})(\text{OH})]^{-}$	15,9 (1)
$[\text{Ga}(\text{L})]$	25,31 (5)
$[\text{Ga}(\text{L})\text{H}]^{+}$	32,0 (1)
$[\text{Ga}(\text{L})\text{H}_2]^{2+}$	38,70 (8)
$[\text{Ga}(\text{L})\text{H}_3]^{3+}$	43,9 (1)

Tab. 10 – Protonizační konstanty terminálních aminoskupin NOTP^{am} a komplexu Ga–NOTP^{am} ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$).

$\log K$	$\log K(\text{Ga–NOTP}^{\text{am}})$	$\log K(\text{NOTP}^{\text{am}})$
$\log K_1$	6,66	8,84
$\log K_2$	6,74	8,16
$\log K_3$	5,19	7,30

Na Obr. 26 je distribuční diagram systému Ga–NOTP^{am}. Ke komplexaci dochází již ve velmi kyselém prostředí, což je důsledkem vysoké hodnoty termodynamické konstanty stability. Ze stejného důvodu nedochází k tvorbě pevného hydroxidu gallitého. Protonizovaná forma komplexu je v roztoku zastoupena až do pH = 8. Od pH = 6 vzniká plně deprotonizovaná forma. Již při pH = 8–10 vzniká monohydroxo komplex a tetrahydroxogallitanový anion.



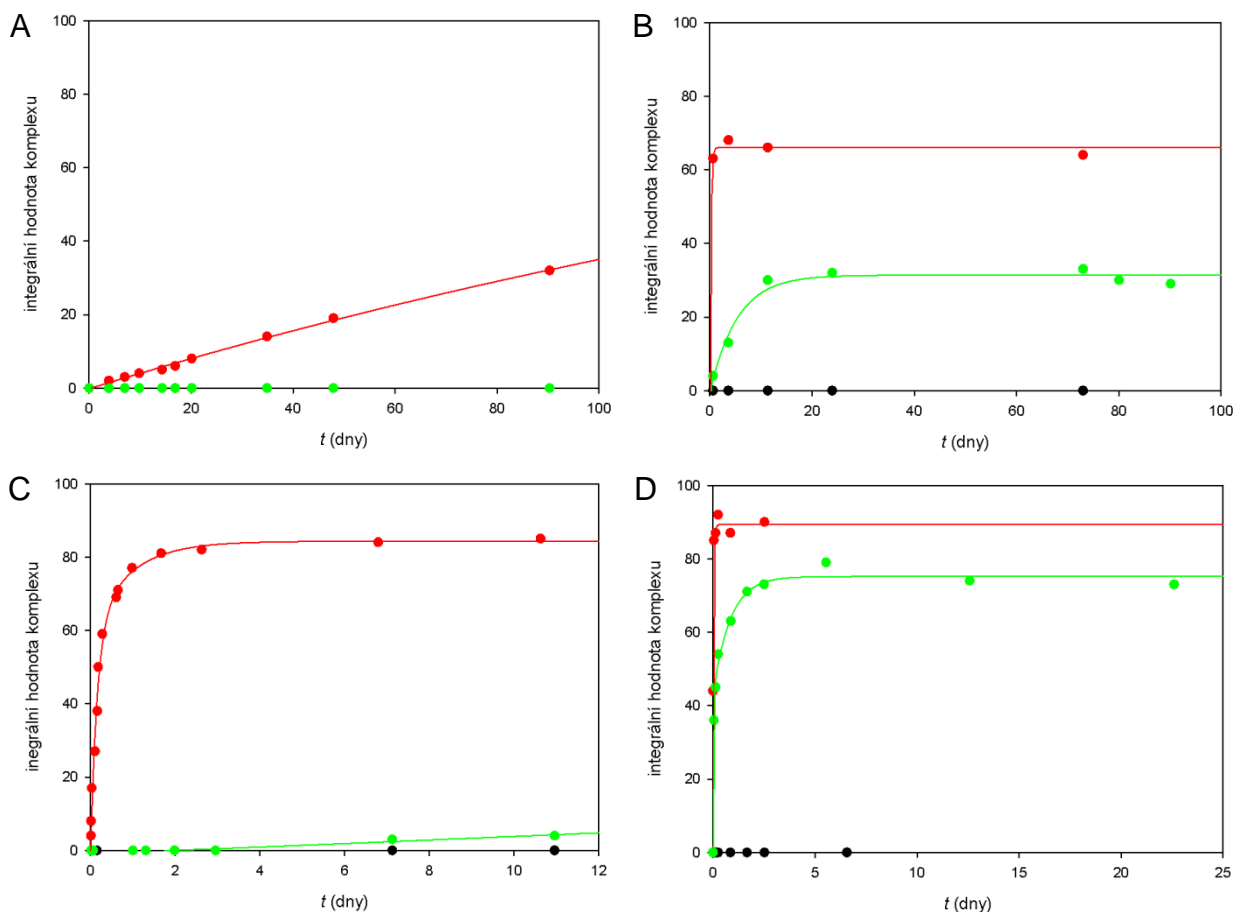
Obr. 26 – Distribuční diagram systému Ga–NOTP^{am} ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$, $c = 4\text{ mM}$).

Systémy Al–NOTP^{am} a Al–NOTA

Termodynamické vlastnosti gallitých komplexů byly již v minulosti intenzivně studovány. Oproti tomu je termodynamika ale i kinetické vlastnosti hlinitých komplexů méně prozkoumanou oblastí. Proto byla pozornost věnována i systému Al–NOTA. Tento ligand byl vybrán z důvodu jeho úspěšného využití v podobě kontrastní látky Alfatide, viz *Teoretický úvod*.

Studie rovnováhy systémů Al–NOTP^{am} a Al–NOTA, viz Obr. 27, ukázaly, že při pH ≈ 10 nedochází ke vzniku komplexu a to z důvodu tvorby termodynamicky stabilního tetrahydroxohlinitanového aniontu. Při mírně kyselém pH se komplex Al–NOTA při laboratorní teplotě tvoří v rámci 1 týdne, ale v případě Al–NOTP^{am} roztok nedospěl do rovnováhy ani za 3 měsíce. Při velmi kyselém pH pak komplexace při laboratorní teplotě

téměř neprobíhá, a proto byla konstanta stability stanovena při 72 °C. Abychom zajistili, že systém bude v rovnováze, systém byl ponechán při 72 °C 1 měsíc v případě Al-NOTA, 3 měsíce u Al-NOTP_{am}.

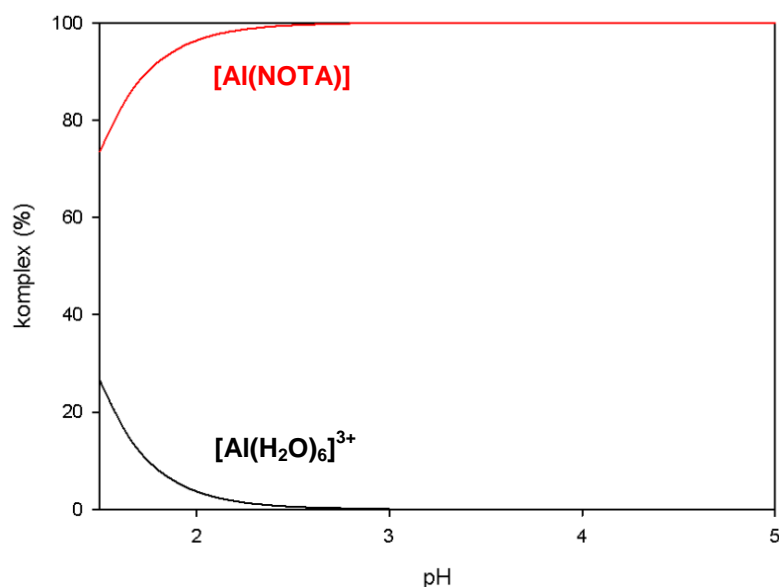


Obr. 27 — ^{27}Al NMR experimenty provedené pro zjištění doby dosažení rovnováhy systémů Al-NOTP_{am} a Al-NOTA (A: Al-NOTP_{am} při laboratorní teplotě, B: Al-NOTP_{am} při 70 °C, C: Al-NOTA při laboratorní teplotě, D: Al-NOTA při 70 °C, pH ● ≈ 2, ● ≈ 4, ● ≈ 10 (Al-NOTA) 12 (Al-NOTP_{am})).

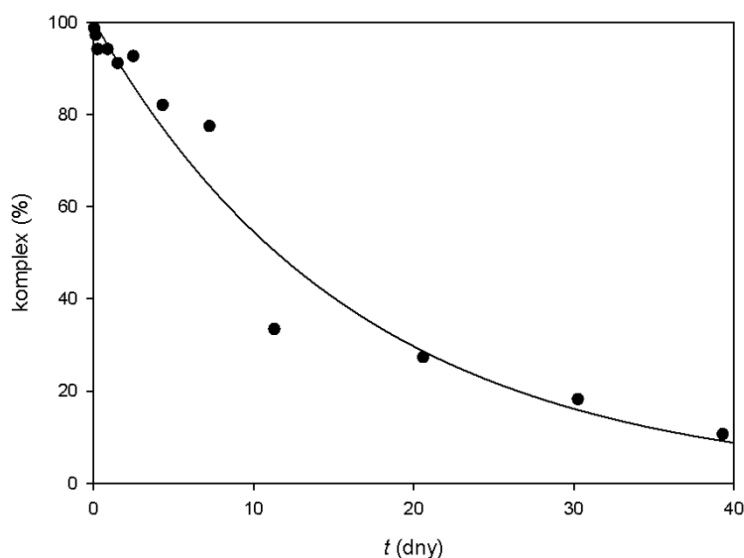
Distribuční diagram systému Al-NOTA je na Obr. 28. Systém byl studován pouze v oblasti pH 1,5–5 z důvodu vzniku pevné fáze při vyšším pH. Z grafu je patrné, že při pH nižším než 2,5 již nedochází k úplné komplexaci a v systému je rovnováha mezi aquakomplexem a komplexem Al-NOTA. To je způsobeno nižší hodnotou konstanty stability komplexu Al-NOTA při 72 °C $\log\beta = 21,5$ (1). Tato hodnota je mnohem nižší než pro komplex Ga-NOTA $\log\beta = 29,60$ při 25 °C.^[52] Jako vysvětlení se nabízí rozměr kavity. Prostor vytvořený makrocyklem a pendatními rameny je pravděpodobně vhodnější pro gallitý kation, který má větší iontový průměr (62 pm) oproti hlinitému kationtu (54 pm).^[67] Pro hlinitý ion je kavita příliš velká.

Stanovení konstanty stability komplexu Al-NOTP_{am} nebylo možné. Systém dosahuje rovnováhy velice pomalu, a proto bylo vyžadováno dlouhodobé zahřívání při 72 °C. V těchto podmínkách však dochází k rozkladu ligandu. Samotný komplex je však stálý a je

nepravděpodobné, že by docházelo k jeho disociaci ve studovaném rozsahu pH 1–5. I ve velmi kyselém prostředí (6 M HCl) byl poločas rozpadu komplexu 11 dní, viz Obr. 29.



Obr. 28 – Distribuční diagram Al-NOTA ($T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 0,1\text{ M}$, $c = 4\text{ mM}$).



Obr. 29 – Rozpad komplexu Al-NOTP^{am} při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dle ^{27}Al NMR (6 M HCl).

3.6. Formace a disociace komplexů

Formace komplexu Ga-NOTP^{am}

Radioizotop ^{68}Ga je získáván elucí roztokem kyseliny chlorovodíkové, viz *Teoretický úvod*, a proto komplexace bez nutnosti převedení iontu do méně kyselého prostředí by ušetřila značnou část doby potřebné k přípravě radiofarmaka. Z tohoto důvodu byla studována rychlost formace komplexu při pH 0, 1 a 2,7.

Dle ^{71}Ga NMR spekter dochází k úbytku hexaaquagallitého kationtu ještě před vznikem „in-cage“ komplexu. To naznačuje vznik „out-of-cage“ komplexu či při vyšším pH vznik hydroxočastic $\text{Ga}(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_x$, které jsou málo symetrické a v případě kvadrupólového jádra ^{71}Ga nepozorovatelné pomocí ^{71}Ga NMR. Byla vypočítána doba $t(50\%)$, za kterou vzniklo 50 % komplexu a doba $t(100\%)$, za kterou bylo vytvořeno více než 98 % komplexu, viz Tab. 11. Výsledky byly srovnány se strukturně podobnými ligandy a ligandem NOTA, které byly studovány za analogických podmínek, viz Obr. 24.

Tab. 11 — Rychlost komplexace gallitého kationtu fosfinátovými ligandy ve velmi kyselém pH při laboratorní teplotě.

	pH	$t(50\%)$	$t(100\%)$
NOTP^{am}	0	35 dní	199 dní
	1	6 h	13 dní
	2,7	35 min	28 hodin
NOTP^H[52]	0	36 dní	240 dní
	1	21 h	15 dní
	2,8	30 min	3,7 h
NOTP^{OH}[52]	0	3,8 dní	31 dní
	1	14 min	60 min
	2,8	neměřitelné**	< 5 min
NOTP^{PrA}[52]	0	–	12 dní
	1	3 min	12 min
	2,8	neměřitelné**	< 5 min
NOTA ^[52]	0	komplexace nepozorována	
	1	4,5 h	6 dní
	2,8	neměřitelné**	< 5 min

**příliš rychlá komplexace

Rychlost komplexace roste s pH. To vypovídá o bazicky katalyzovaném systému, kdy nejprve dochází k deprotonizaci ligandu a až následně ke komplexaci gallitého kationtu. Ligandy NOTP^{OH} a NOTP^{PrA} jsou v této řadě jednoznačně nejrychleji koordinující ligandy. Oba tyto makrocikly umožňují silnou interakci s gallitými ionty prostřednictvím pendantních ramen a tvorba „in-cage“ komplexu je tak značně urychlena. Ligand NOTA komplexuje srovnatelně rychle jako NOTP^{OH} a NOTP^{PrA} až při pH 2,8, jelikož k deprotonizaci acetátových pendantních ramen dochází až při vyšším pH. Makrociklus NOTP^H patří mezi pomaleji koordinující se ligandy pravděpodobně, protože jeho interakce s gallitými ionty v podobě „out-of-cage“ komplexu je podstatně slabší. Ligand NOTP^{am} je rychlostí komplexace srovnatelný s ligandem NOTP^H. Afinita gallitého kationtu jako tvrdého kovu je totiž k dusíkovým atomům nižší, a proto dochází k interakci především prostřednictvím fosinátových atomů kyslíku. Dalším efektem je elektrostatické odpuzování mezi gallitým kationtem a protonizovanými terminálními aminoskupinami.

* V „in-cage“ komplexu je atom kovu vázán dusíkovými atomy makrociklu a kyslíkovými atomy pendantních ramen, v „out-of-cage“ komplexu dochází ke koordinaci pouze prostřednictvím pendantních ramen.

Studium formace Al–NOTP^{am} a Al–NOTA

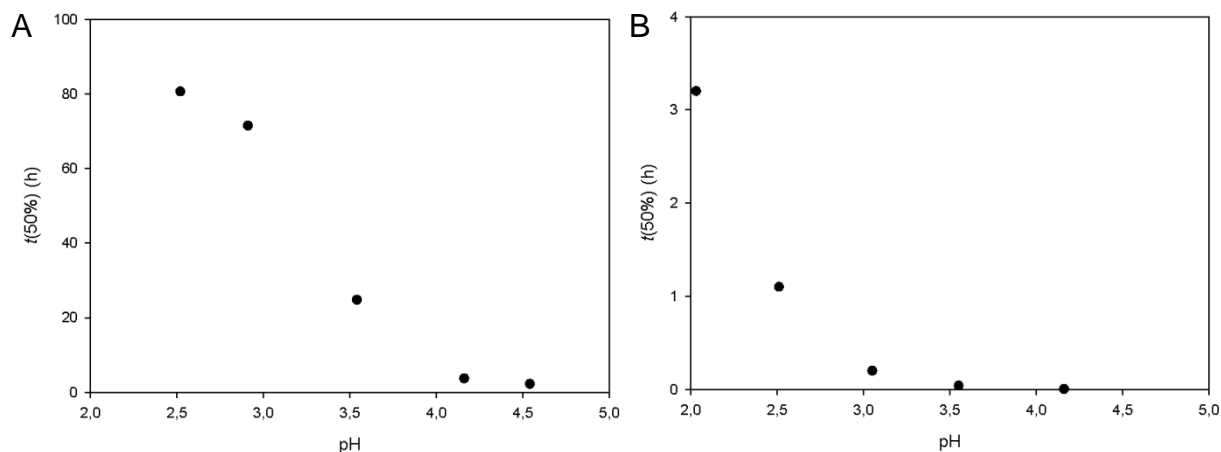
Formace Al–NOTP^{am} byla studována při teplotě 70 °C. Dle ²⁷Al NMR spekter systému Al–NOTP^{am} hned po smíchání reaktantů vzniká při pH 2,5, 3 a 3,5 „out-of-cage“ komplex, který postupně přechází na „in-cage“ komplex. Při vyšším pH signály „out-of-cage“ komplexu a hexaaquahlinitého kationtu zanikají pravděpodobně z důvodu tvorby nesymetrických Al(OH)_x(H₂O)_x částic. U systému Al–NOTP^{am} docházelo k ustavování rovnováhy mezi komplexem a hexaaquahlinitým kationtem, což odpovídá nižší stabilitě komplexu. S pH rostlo množství vytvořeného komplexu. Zároveň však bylo prokázáno, že při nižším pH roste rychlost rozpadu ligandu NOTP^{am}. Proto získané výsledky mohou být částečně zkreslené. Ze získaných dat byla stanovena doba *t*(50 %), kdy komplexace proběhla z 50 %, viz Tab. 12. Pro srovnání byla tato studie provedena i pro systém Al–NOTA, u kterého však nebyl pozorován vznik „out-of-cage“ komplexu. Srovnáme-li hodnoty v Tab. 12, je evidentní, že NOTA komplexuje hlinité kationty rychleji a to až o více než jeden řád.

Tab. 12 – Rychlost formace komplexu Al–NOTA a Al–NOTP^{am} při 70 °C.

pH	<i>t</i> (50%)	
	Al–NOTP ^{am} [h]	Al–NOTA [h]
2,1	–	3,2
2,5	81	1,1
3,1/2,9	72	0,2
3,6/3,5	25	4.10 ⁻²
4,2	4,1	neměřitelné*
4,5	2,4	–

*příliš rychlá komplexace

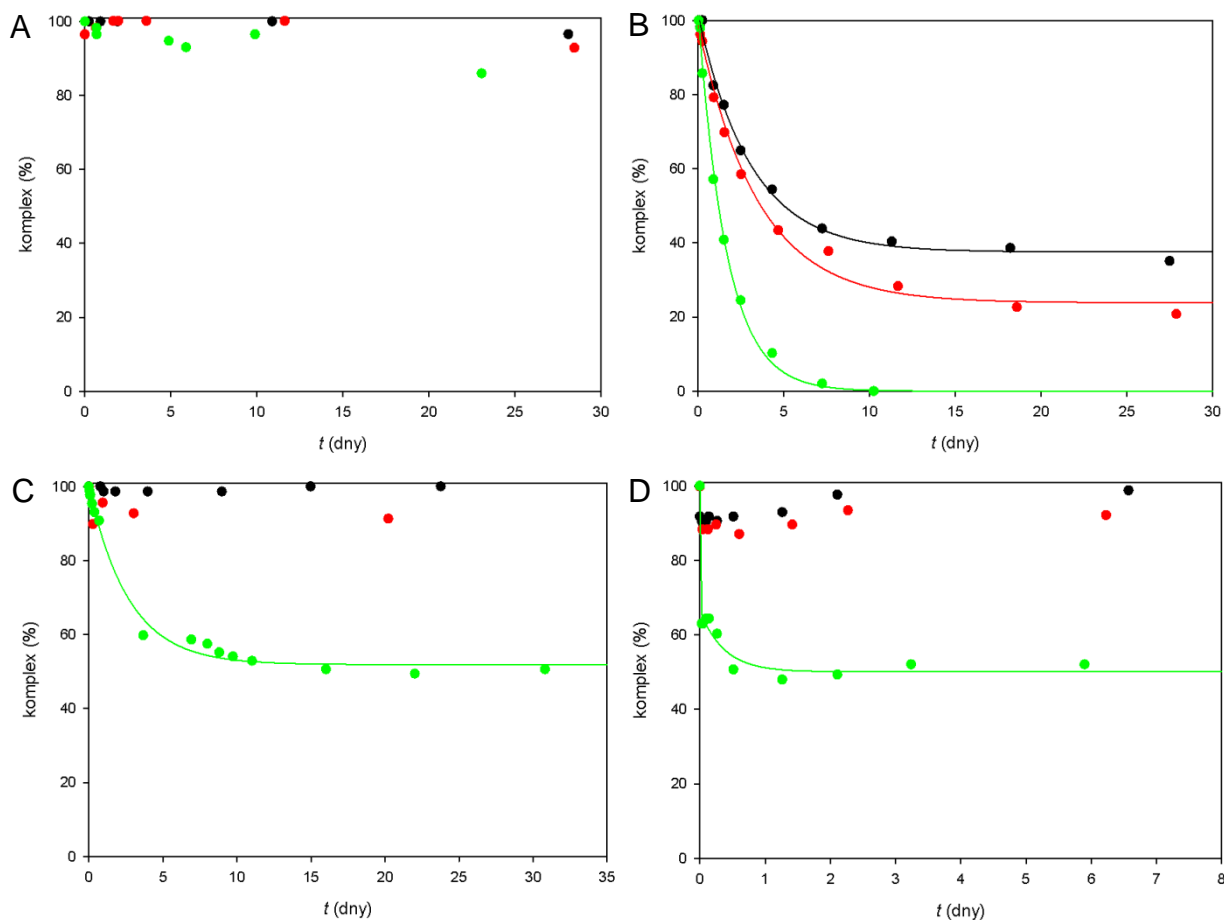
Na Obr. 30 jsou grafy závislosti *t*(50 %) na pH. Dle těchto dat se v obou případech doba komplexace s rostoucím pH snižuje. Jde tedy opět o bazicky katalyzované systémy, závislost je téměř exponenciální.



Obr. 30 – Doby, za kterou komplexace při 70 °C proběhne z 50 % v závislosti na pH (25 °C) (A: Al–NOTP^{am}, B: Al–NOTA).

Disociace Al–NOTP^{am} a Al–NOTA

Byla studována rychlost disociace systémů Al–NOTP^{am} a Al–NOTA. Primární experimenty ukázaly, že komplex Al–NOTA podléhá disociaci při pH vyšším než 10 nezávisle na teplotě, zatímco v případě Al–NOTP^{am} rozklad při laboratorní teplotě prakticky neprobíhá, viz Obr. 31. Proto byly studie provedeny při 70 °C.



Obr. 31 — Disociace komplexů Al–NOTA a Al–NOTP^{am} dle ²⁷Al NMR (A: Al–NOTP^{am} při laboratorní teplotě, B: Al–NOTP^{am} při 70 °C, C: Al–NOTA při laboratorní teplotě, D: Al–NOTA při 70 °C, pH ● ≈ 7,5 (Al–NOTA), 7 (Al–NOTP^{am}); ● ≈ pH 11 (Al–NOTA), 10 (Al–NOTP^{am}); ● ≈ pH 12).

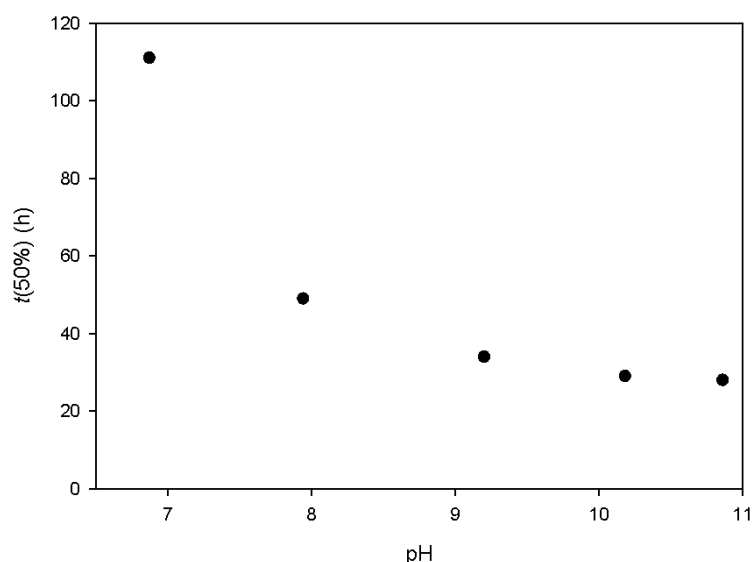
Systém Al–NOTA byl studován pouze při pH 10,2 a 10,9 při 70 °C. Ve vzorku o pH 10,2 docházelo k ustavování rovnováhy mezi komplexem a tetrahydroxohlinitanovým aniontem. Ve vzorku o pH 10,9 došlo již k úplné disociaci. Studium ve velmi bazických roztocích je obtížné z důvodu absorpce oxidu uhličitého, a proto byla kyveta s měřeným roztokem naplněna argonem a utěsněna teflonovou páskou. Tímto bylo zajištěno, že pH roztoku zůstalo konstantní. Komplex Al–NOTP^{am} podléhá disociaci při 70 °C již při pH 7 pravděpodobně z důvodu nižší termodynamické stability, a proto byl studován v širším rozsahu pH 7–11. Při pH nižším než 10,2 nedocházelo k úplné disociaci a systém dosahoval rovnováhy s hydroxidem hlinitým a tetrahydroxohlinitanovým aniontem. Množství disociovaného komplexu rostlo s pH, až při pH 10,9 došlo k úplné disociaci. Tab. 13 ukazuje dobu $t(50\%)$, za kterou došlo k disociaci polovičního množství komplexu.

Tab. 13 — Rychlost disociace komplexu Al–NOTA a Al–NOTP^{am} při 70 °C.

pH	$t(50\%)$	
	AlNOTP ^{am} [h]	AlNOTA [h]
6,9	111	–
7,9	49	–
9,2	34	–
10,2	29	1,8
10,9	28	1,1

Srovnáme-li rychlost disociace při pH 10,2 a 10,9 mezi Al–NOTA a Al–NOTP^{am}, komplex Al–NOTA se rozkládá rychleji a to řádově.

Na Obr. 31 je závislost $t(50\%)$ komplexu Al–NOTP^{am} na pH. S vyšším pH dochází k rozpadu komplexu rychleji, což poukazuje na bazicky katalyzovaný děj.



Obr. 31 — Závislost doby, kdy se rozloží poloviční množství komplexu Al–NOTP^{am} při 70 °C na pH (25 °C).

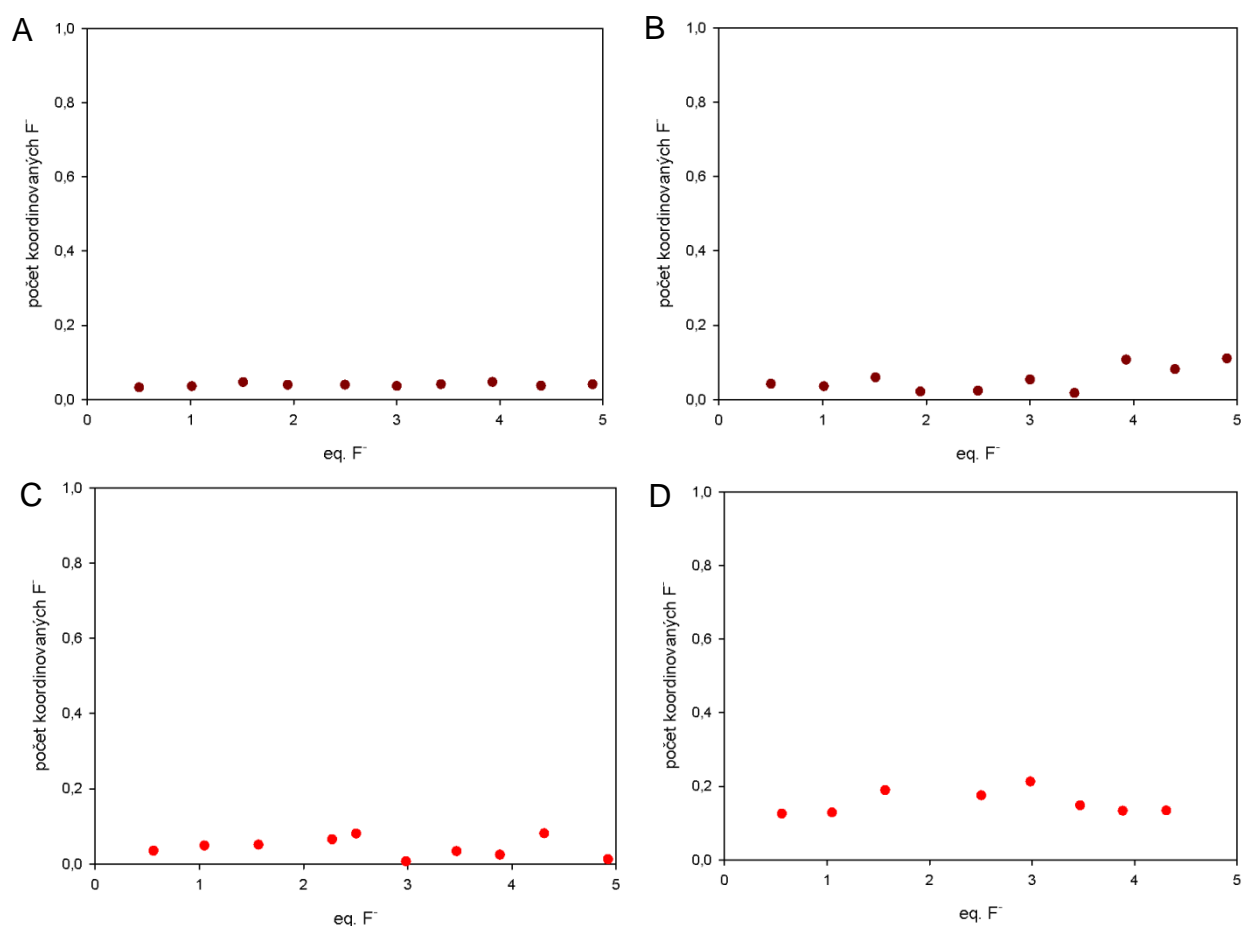
3.7. Koordinační studie fluoridových aniontů

Koordinace F^-

Byla studována koordinace fluoridových iontů hlinitými komplexy Al–NOTP^{am} a Al–NOTA pomocí iontově selektivní fluoridové elektrody. Jelikož jde v obou případech o hexadentátní ligandy NOTP^{am} a NOTA, je koordinační sféra hlinitého kationtu již vysycena. Koordinace fluoridu by tak pravděpodobně probíhala záměnou za již koordinovanou funkční skupinu.

Hodnota pH roztoku byla zvolena tak, aby v roztoku bylo pouze malé množství kyseliny fluorovodíkové ($pK_a = 3,2$)^[68] a hydroxo aniontů, které by s hlinitým iontem tvořily

hydroxočástice. Zároveň bylo výhodné, aby terminální aminoskupiny na pendantních ramenech zůstaly protonizovány. Experiment proto probíhal při pH 4,3. Výsledky měření jsou zaznamenány na Obr. 32.



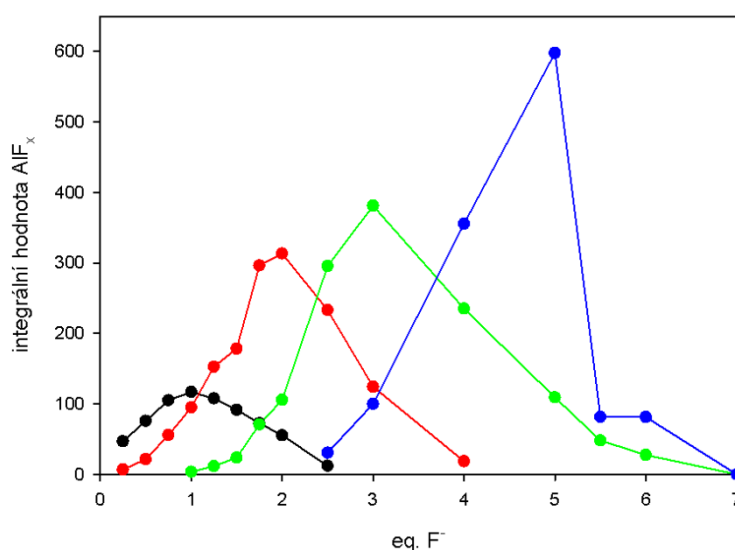
Obr. 32 — Závislosti počtu koordinovaných fluoridových aniontů na počtu ekvivalentů fluoridových iontů v roztoku. Studium probíhalo pomocí iontově selektivní fluoridové elektrody při laboratorní teplotě (A: Al-NOTP^{am} při laboratorní teplotě, B: Al-NOTP^{am} po inkubaci 23 minut při 100 °C, C: Al-NOTA při laboratorní teplotě, D: Al-NOTA po inkubaci 23 minut při 100 °C, $c_{\text{komplex}} = 0,25 \text{ mM}$, $c_{\text{F}} = 0,125\text{--}1,25 \text{ mM}$, $0,1 \text{ M}$ 1-methylpiperazin/ HClO_4 pH = 4,4).

Z Obr. 32 je patrné, že ke koordinaci fluoridových iontů na komplex nedochází. Mírné odchylky od nulové hodnoty počtu koordinovaných fluoridů jsou v rámci experimentální chyby. Stejný systém byl studován pomocí ^{19}F NMR ve dvou různých poměrech komplex:fluorid 1:1 a 1:3 v NMR kyvetách s PTFE vložkou. Ve spektru byl pozorován pouze signál volného fluoridového aniontu. Tím bylo potvrzeno, že hexadentátní komplexy Al-NOTA a Al-NOTP^{am} jsou příliš stabilní a neumožňují koordinaci fluoridových aniontů.

Komplexace AlF_x ligandy NOTP^{am} a NOTA

Prvním krokem bylo studium samotného systému AlF_x . Byla provedena titrace hlinitých iontů roztokem fluoridu sodného v pufru o pH 4,3, kde systém dosáhl rovnováhy po 10 minutách zahřívání při 100 °C. Za těchto podmínek bylo možné zjistit, jaké signály

odpovídají částicím AlF_x v navazujících experimentech. V ^{19}F NMR spektru bylo pozorováno pět signálů, které odpovídaly částicím $[\text{AlF}_x]^{(3-x)}$ ($x = 1-4$) a volnému fluoridovému aniontu. Na Obr. 33 je závislost zastoupení částic AlF_x na počtu ekvivalentů F^- v roztoku. Částice s nízkým počtem fluoridových aniontů vznikají především při nižší koncentraci fluoridových aniontů a svého maximálního zastoupení dosahují při poměru $\text{Al}:\text{F} = 1$ pro $[\text{AlF}]^{2+}$ a $\text{Al}:\text{F} = 2$ pro $[\text{AlF}_2]^+$. Stejný výsledek je i v případě $[\text{AlF}_3]$. Poslední pozorovaný signál ve spektru by mohl odpovídat částici $[\text{AlF}_4]^-$ či $[\text{Al}(\text{OH})_x\text{F}_y]^{(3-x-y)}$. Dle Bodor et al. však chemické posuny jednotlivých částic nejsou závislé na pH, a proto byl signál přiřazen částici $[\text{AlF}_4]^-$.^[69] Dle diagramu je maximální množství $[\text{AlF}_4]^-$ vytvořeno v poměru $\text{Al}:\text{F} = 5$ a při vyšším poměru jeho zastoupení v roztoku klesá. Při poměru vyšším než $\text{Al}:\text{F} = 7$ v ^{19}F NMR spektru zcela vymizel signál AlF_x částic a byl pozorován pouze signál volných fluoridových aniontů. Bodor et al. tento fakt vysvětluje nízkou rozpustností částice $[\text{AlF}_4]^-$, kterou lze potlačit přidáním R_4N^+ kationtu do roztoku.^[69]



Obr. 33 – Závislost zastoupení $[\text{AlF}_x]^{(3-x)}$ na počtu ekvivalentů fluoridových aniontů dle ^{19}F NMR. (● – $[\text{AlF}]^{2+}$; ● – $[\text{AlF}_2]^+$; ● – $[\text{AlF}_3]$; ● – $[\text{AlF}_4]^-$, $c_{\text{Al}} = 10 \text{ mM}$, $c_{\text{F}} = 2,5-70 \text{ mM}$).

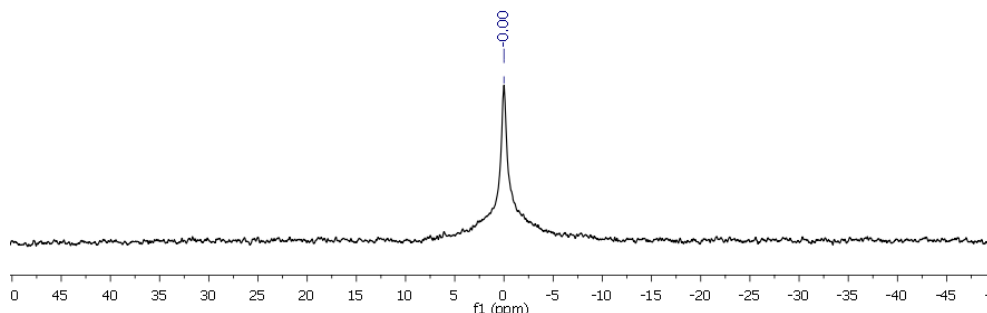
Monosubstituovaný komplex měl nejnižší chemický posun, u více substituovaných derivátů chemický posun postupně rostl, viz Tab. 14. Pološířka signálů $[\text{AlF}]^{2+}$ a $[\text{AlF}_2]^+$ byla od 18 do 24 Hz. Podobnou pološířku měl i signál $[\text{AlF}_3]$, ale od poměru $\text{Al}:\text{F} = 3$, kdy se ve spektru objevil i signál $[\text{AlF}_4]^-$, začala jeho pološířka značně růst až na hodnotu 173 Hz v poměru $\text{Al}:\text{F} = 5$ a následně klesla na hodnotu 80 Hz při poměru $\text{Al}:\text{F} = 6$. Pološířka signálu $[\text{AlF}_4]^-$ byla ze všech čtyřech pozorovaných signálů největší a to v rozmezí 70–340 Hz. Dle Martinez et al. je změna pološířky signálů $[\text{AlF}]^{2+}$ a $[\text{AlF}_2]^+$ způsobena chemickou výměnou.^[70]

V ^{27}Al NMR spektrech byly patrné dva signály při stejném chemickém posunu 0 ppm, ale s odlišnou pološířkou, viz Obr. 34. Signál s pološířkou 60 Hz, který odpovídá

aquakomplexu hlinitého kationtu a signál s pološířkou okolo 500 Hz, který pravděpodobně náleží částicím AlF_x . Při poměru Al:F vyšším než 1 byl ve spektru pozorován pouze rozšířený signál při 0 ppm, jehož intenzita od poměru Al:F = 4 klesala až při poměru Al:F ≥ 7 zcela zanikl, což souhlasí s vymizením signálu AlF_x ve spektru ^{19}F NMR a potvrzuje tak možné srážení částic AlF_x , kde $x \geq 4$.

Tab. 14 — Chemické posuny částic $[\text{AlF}_x]^{(3-x)}$ dle ^{19}F NMR. Spektra byla referencována na 10 mM NaF v H_2O .

$[\text{AlF}_x]^{(3-x)}$	δ [ppm]
$[\text{AlF}]^{2+}$	-36,8
$[\text{AlF}_2]^+$	-36,0
$[\text{AlF}_3]$	-34,4
$[\text{AlF}_4]^-$	-32,9



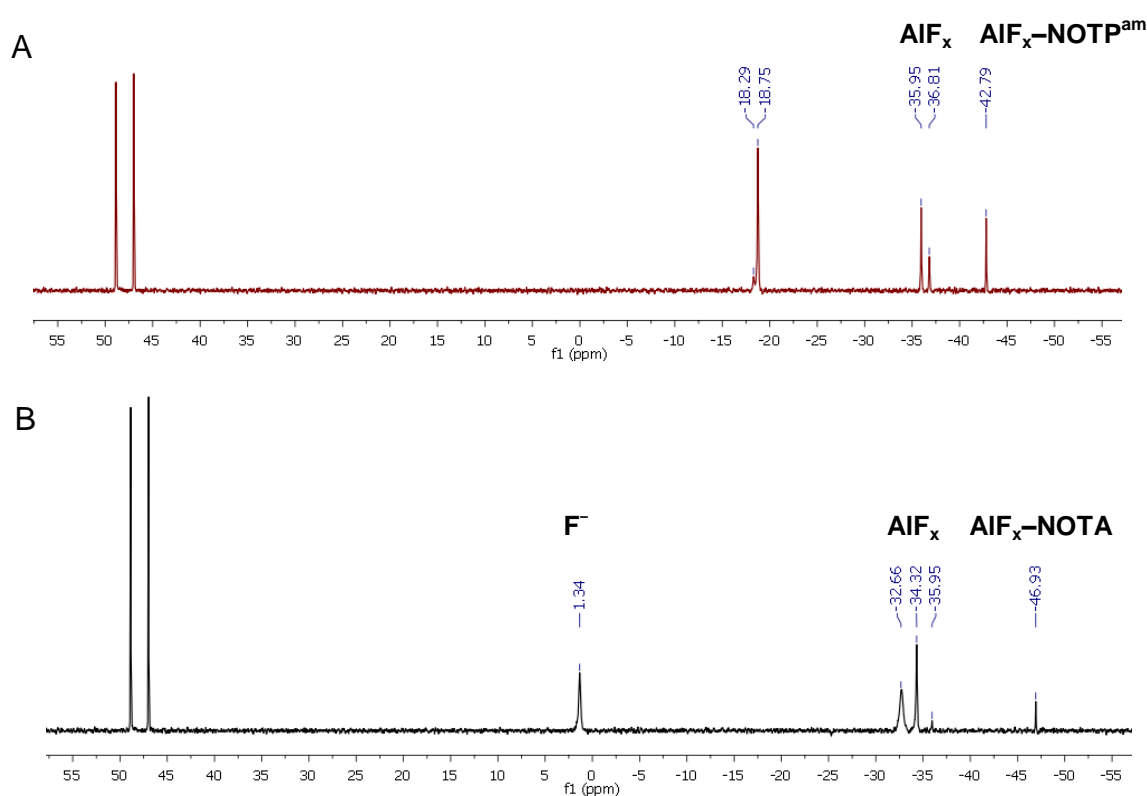
Obr. 34 – ^{27}Al NMR spektrum částice AlF_x ($T = 25\text{ °C}$). Spektrum bylo měřeno v NMR kyvetě s PTFE vložkou v roztoku 1 M 1-methylpiperazin/HCl pH = 4,30, $c_{\text{F}} = 7,5\text{ mM}$, $c_{\text{Al}} = 10\text{ mM}$. Spektra byla referencována na 0,1 M $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ v 1 M HClO_4 .

Studium širokého spektra hlinitých komplexů pomocí ^{27}Al NMR ukázalo korelaci symetrie komplexu s chemickým posunem. Oktaedrické komplexy se nachází v rozmezí chemického posunu -40–20 ppm, zatímco tetraedrické komplexy se pohybují v oblasti 60–110 ppm.^[70] Signál $[\text{AlF}_4]^-$ odpovídající tetraedrickému prostorovému uspořádání je navíc vysoce symetrický, a proto by ve ^{27}Al NMR spektru měl být snadno rozpoznatelný. Jelikož ve ^{27}Al NMR spektrech nebyl pozorován žádný signál v tetraedrické oblasti, byly identifikované signály připsány částicím $[\text{AlF}_x(\text{H}_2\text{O})_{6-x}]^{(3-x)}$ ($x = 1–4$) s oktaedrickou symetrií.

V návaznosti na studium částic AlF_x , byl studován systém $\text{AlF}_x\text{--NOTA}$, kde v ^{19}F NMR spektru byl pozorován kromě signálů AlF_x částic další signál při -46,93 ppm, viz Obr. 35. Dle Farkas et al. signál ternárního komplexu Al-NOTA-F při pH 4 v pufru AcOH/NaOH má chemický posun -47 ppm.^[71] Proto byl tento signál přiřazen ternárnímu komplexu $\text{AlF}_x\text{--NOTA}$.

Analogicky byl studován systém $\text{AlF}_x\text{--NOTPam}$. Při experimentech bylo zjištěno, že v ^{19}F NMR spektru vznikají kromě signálů AlF_x další 3 signály. Jeden signál při nižším

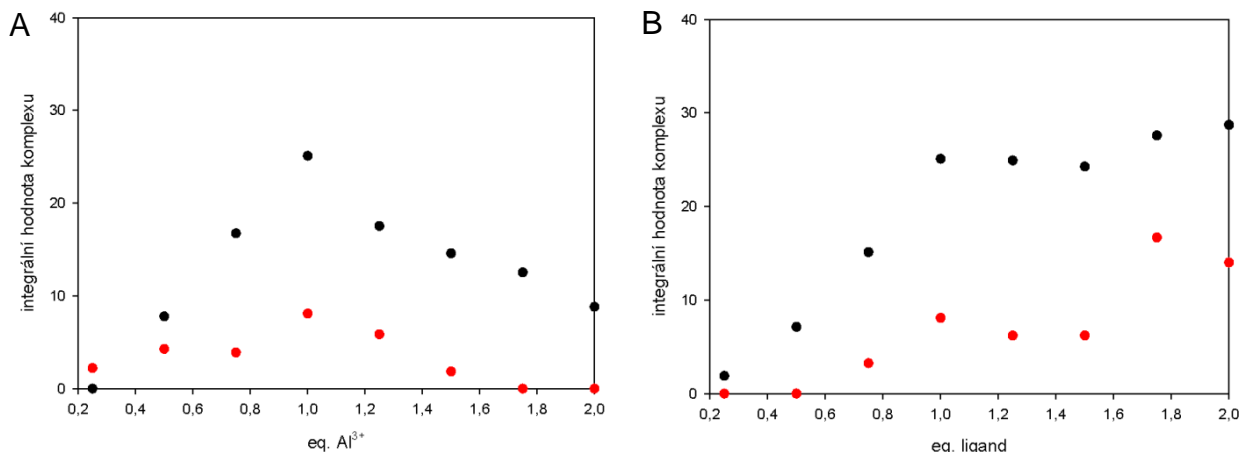
chemickém posunu $-42,97$ ppm a dva signály při vyšším chemickém posunu $-18,29$ a $-18,75$ ppm, viz Obr. 35. Při studiu systému F-NOTP^{am} za stejných podmínek, nebyl v ^{19}F NMR spektru pozorován žádný z těchto signálů. Tyto signály proto odpovídají částici $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$. V ^{27}Al NMR spektrech byly pozorovány celkem 3 signály. Signál při 0 ppm, který odpovídá pravděpodobně AlF_x částicím, signál při 38,6 ppm, odpovídající komplexu $\text{Al-NOTP}^{\text{am}}$ a signál v rozmezí chemického posunu 7,8–8,3 ppm, což odpovídá oblasti tvorby „out-of-cage“ komplexu $\text{Al-NOTP}^{\text{am}}$. Nicméně kvůli poměrně vysoké pološířce signálů 90–150 Hz, je diskutabilní, zda tyto signály nepřipadají částicím in-cage a out-of-cage $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$. Signál strukturně podobného komplexu jako je $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$ by však měl mít v ^{19}F NMR spektru velice podobný posun jako $\text{AlF}_x\text{-NOTA}$. Proto byl signál při $-42,79$ ppm přiřazen komplexu $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$. Tato úvaha byla podpořena chemickým posunem částice Al-EDTA-F , který byl při $\text{pH} = 6$ roven $-49,8$ ppm.^[72]



Obr. 35 — ^{19}F NMR spektra systémů $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$ (A) a $\text{AlF}_x\text{-NOTA}$ (B) ($T = 25$ °C). Spektra byla měřena v NMR kyvetách s PTFE vložkou v roztoku 1 M 1-methylpiperazin/HCl $\text{pH} = 4,30$, $c_{\text{F}} = 10$ mM, $c_{\text{Al}} = 10$ mM, $c_{\text{ligand}} = 15$ mM. Spektra byla referencována na 10 mM NaF v H_2O .

Na Obr. 36 jsou grafy závislosti integrální intenzity ^{19}F NMR signálů $\text{AlF}_x\text{-NOTA}$ ($\delta = -46,93$ ppm) a $\text{AlF}_x\text{-NOTP}^{\text{am}}$ ($\delta = -42,79$ ppm) na poměru hlinité soli a ligandu v roztoku. Z grafů je patrné, že zastoupení obou komplexů má velice podobný trend. Při nízké koncentraci hlinitých iontů téměř nedochází k tvorbě ternárních komplexů a to pravděpodobně z důvodu tvorby AlF_x částic s vysokou hodnotou x . Při vysoké koncentraci hlinitých iontů je pravděpodobně upřednostňována komplexace volného hlinitého iontu před

částicí AlF_x . Nejvyšší integrální intenzity je dosaženo v případě stejné koncentrace fluoridových aniontů a hlinitých kationtů, kde v roztoku vznikají převážně mono a disubstituované částice AlF_x , vhodné ke koordinaci. Množství ternárního komplexu roste s koncentrací ligandu. Z naměřených hodnot je evidentní, že za těchto podmínek dosahuje komplex $\text{AlF}_x\text{--NOTPam}$ vyšších výtěžků než $\text{AlF}_x\text{--NOTA}$. Pro všeobecné závěry je však třeba provést mnohem více experimentů s různými poměry reaktantů Al^{3+} , F^- , ligand.



Obr. 36 — Grafy závislosti integrální intenzity ^{19}F NMR signálů $\text{AlF}_3\text{--NOTA}$ ($\delta = -46,93 \text{ ppm}$) a $\text{AlF}_3\text{--NOTPam}$ ($\delta = -42,79 \text{ ppm}$) na ekvivalentech hlinité soli a ligandu v roztoku ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) (A: $C_{\text{F}} = C_{\text{ligand}} = 10 \text{ mM}$, $C_{\text{Al}} = 2,5\text{--}20 \text{ mM}$, B: $C_{\text{F}} = C_{\text{Al}} = 10 \text{ mM}$, $C_{\text{ligand}} = 2,5\text{--}20 \text{ mM}$, ● – $\text{AlF}_3\text{--NOTPam}$, ● – $\text{AlF}_3\text{--NOTA}$).

4. Závěr

Byly připraveny ligandy NOTPam a NODPam . U ligandu NOTPam byly studovány jeho koordinační vlastnosti s gallitými a hlinitými ionty. Ligand komplexuje gallité kationty velice pomalu v řádu dnů až měsíců ve velmi kyselém pH při laboratorní teplotě, nicméně komplex má vysokou hodnotu konstanty stability $\log\beta = 25,31$. Bylo zjištěno, že ligand NOTPam je nestálý v kyselém prostředí při vysokých teplotách, tato skutečnost komplikovala studium komplexace. Proto například nebylo možné určit konstantu stability systému Al--NOTPam . Při $70 \text{ }^\circ\text{C}$ hlinitý komplex Al--NOTPam v bazické oblasti pH podléhá disociaci. Formace komplexu je extrémně pomalá a to v řádech dnů při $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pro srovnání byl studován i systém Al--NOTA . K formaci komplexu při $70 \text{ }^\circ\text{C}$ dochází v řádu hodin. Komplex podléhá disociaci až při $\text{pH} > 10$. Konstanta stability systému Al--NOTA při $72 \text{ }^\circ\text{C}$ je $\log\beta = 21,5$.

U obou systémů byly studovány koordinační vlastnosti s fluoridovými anionty. Žádný z komplexů neumožňuje koordinaci fluoridových aniontů, ale dochází ke komplexaci částice AlF_x volnými ligandy NOTPam a NOTA za vzniku ternárních komplexů $\text{AlF}_x\text{--NOTPam}$ a $\text{AlF}_x\text{--NOTA}$. Optimalizace podmínek vzniku komplexů a jejich stabilita však potřebují rozsáhlejší studium.

5. Literatura

1. Basu, S. *et al.* Fundamentals of PET and PET/CT imaging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1228**, 1–18 (2011).
2. Pimlott, S. L. & Sutherland, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 149–62 (2011).
3. Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R. & Gee, A. D. Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **47**, 8998–9033 (2008).
4. Cai, L., Lu, S. & Pike, V. W. Chemistry with ^{18}F Fluoride Ion. *European J. Org. Chem.* 2853–73 (2008).
5. Pacák, J. & Černý, M. Deoxyfluorglukosa, mezník ve vývoji pozitronové emisní tomografie (historie jednoho výzkumu). *Chem. Listy* **707**, 704–7 (2002).
6. Smith, G. E., Sladen, H. L., Biagini, S. C. G. & Blower, P. J. Inorganic approaches for radiolabelling biomolecules with fluorine-18 for imaging with Positron Emission Tomography. *Dalton Trans.* **40**, 6196–205 (2011).
7. Jacobson, O., Kiesewetter, D. O. & Chen, X. Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chem.* **26**, 1–18 (2015).
8. Zeng, J.-L., Wang, J. & Ma, J.-A. New Strategies for Rapid (^{18}F) -Radiolabeling of Biomolecules for Radionuclide-Based In Vivo Imaging. *Bioconjugate Chem.* **26**, 1000–3 (2015).
9. Liu, Z. *et al.* An Organotrifluoroborate for Broadly Applicable One-Step ^{18}F -Labeling. **3**, 11876–80 (2014).
10. Wängler, C. *et al.* One-step ^{18}F -labeling of peptides for positron emission tomography imaging using the SiFA methodology. *Nat. Protoc.* **7**, 1946–55 (2012).
11. Kostikov, A. P. *et al.* Synthesis of ^{18}F SiFB: a prosthetic group for direct protein radiolabeling for application in positron emission tomography. *Nat. Protoc.* **7**, 1956–63 (2012).
12. McBride, W. J. *et al.* Improved ^{18}F labeling of peptides with a fluoride-aluminum-chelate complex. *Bioconjugate Chem.* **21**, 1331–40 (2010).
13. D'Souza, C. a, McBride, W. J., Sharkey, R. M., Todaro, L. J. & Goldenberg, D. M. High-yielding aqueous ^{18}F -labeling of peptides via Al^{18}F chelation. *Bioconjugate Chem.* **22**, 1793–803 (2011).
14. Shetty, D. *et al.* Stable aluminium fluoride chelates with triazacyclononane derivatives proved by X-ray crystallography and ^{18}F -labeling study. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 9732–4 (2011).
15. McBride, W. J., D'Souza, C. A., Karacay, H., Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. New lyophilized kit for rapid radiofluorination of peptides. *Bioconjugate Chem.* **23**, 538–47 (2012).
16. Mi, B. *et al.* Pilot Prospective Evaluation of ^{18}F -Alfatide II for Detection of Skeletal Metastases. *Theranostics* **5**, 1115–21 (2015).
17. Lang, L. *et al.* Comparison Study of ^{18}F FAI-NOTA-PRGD2, ^{18}F FPPRGD2, and ^{68}Ga Ga-NOTA-PRGD2 for PET Imaging of U87MG Tumors in Mice. *Bioconjugate Chem.* **22**, 2415–22 (2011).
18. Wan, W. *et al.* First Experience of ^{18}F -Alfatide in Lung Cancer Patients Using a New Lyophilized Kit for Rapid Radiofluorination. *J. Nucl. Med.* **54**, 691–8 (2013).
19. Yu, C. *et al.* ^{18}F -Alfatide II PET/CT in healthy human volunteers and patients with brain metastases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **42**, 2021–8 (2015).
20. Liu, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptide Bioconjugates as Radiotracers Targeting Multiple Integrins. *Bioconjugate Chem.* **26**, 1413–38 (2015).
21. Guo, N. *et al.* Quantitative Analysis and Comparison Study of ^{18}F AlF-NOTA-PRGD2, ^{18}F FPPRGD2 and ^{68}Ga Ga-NOTA-PRGD2 Using a Reference Tissue Model. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
22. Gao, H. *et al.* PET imaging of angiogenesis after myocardial infarction/reperfusion using a one-step labeled integrin-targeted tracer ^{18}F -AlF-NOTA-PRGD2. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39**, 683–92 (2012).
23. Guo, J. *et al.* Comparison of Three Dimeric ^{18}F -AlF-NOTA-RGD Tracers. *Mol. Imaging Biol.* **16**, 274–83 (2014).
24. Guo, J. *et al.* ^{18}F -Alfatide II and ^{18}F -FDG Dual-Tracer Dynamic PET for Parametric,

- Early Prediction of Tumor Response to Therapy. *J. Nucl. Med.* **55**, 154–60 (2014).
25. Wu, C. *et al.* Longitudinal PET Imaging of Muscular Inflammation Using ^{18}F -DPA-714 and ^{18}F -Alfatide II and Differentiation with Tumors. *Theranostics* **4**, 546–55 (2014).
 26. Cai, M. *et al.* PET Monitoring Angiogenesis of Infarcted Myocardium after Treatment with Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Amino Acids* **48**, 811–20 (2016).
 27. Beer, A. J. *et al.* [^{18}F]Galacto-RGD Positron Emission Tomography for Imaging of $\alpha_v\beta_3$ Expression on the Neovasculature in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin. Cancer Res.* **22**, 6610–6 (2007).
 28. Choi, H. *et al.* Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expression Using ^{68}Ga -RGD Positron Emission Tomography in Pediatric Cerebral Infarct. *Mol. Imaging* **12**, 213–7 (2013).
 29. Withofs, N. *et al.* ^{18}F -FPRGD2 PET/CT Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Renal Carcinomas: Correlation with Histopathology. *J. Nucl. Med.* **56**, 361–4 (2015).
 30. Fletcher, J. W. & Kinahan, P. E. PET/CT Standardized Uptake Values (SUVs) in Clinical Practice and Assessing Response to Therapy. *NIH Public Access* **31**, 496–505 (2010).
 31. Sanchez-Crespo, A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Appl. Radiat. Isot.* **76**, 55–62 (2013).
 32. Isabel M. Prata, M. Gallium-68: A New Trend in PET Radiopharmacy. *Curr. Radiopharm.* **5**, 142–9 (2012).
 33. Burke, B. P., Clemente, G. S. & Archibald, S. J. Recent Advances in Chelator Design and Labelling Methodology for ^{68}Ga Radiopharmaceuticals. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **57**, 239–43 (2014).
 34. Smith, D. L., Breeman, W. A. P. & Sims-Mourtada, J. The untapped potential of Gallium 68-PET: The next wave of ^{68}Ga -agents. *Appl. Radiat. Isot.* **76**, 14–23 (2013).
 35. Gabriel, M. *et al.* ^{68}Ga -DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J. Nucl. Med.* **48**, 508–18 (2007).
 36. Kowalski, J. *et al.* Evaluation of positron emission tomography imaging using [^{68}Ga]-DOTA-D-Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide in comparison to [^{111}In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors. *Mol. Imaging Biol.* **5**, 42–8 (2003).
 37. Velikyan, I. Continued rapid growth in ^{68}Ga applications: Update 2013 to June 2014. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58**, 99–121 (2015).
 38. Velikyan, I. *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of ^{68}Ga -labeled collagelin analogs for imaging and quantification of fibrosis. *Nucl. Med. Biol.* **41**, 728–36 (2014).
 39. Xu, B. *et al.* Evaluation of ^{68}Ga -Labeled MG7 Antibody: A Targeted Probe for PET/CT Imaging of Gastric Cancer. *Sci. Rep.* **5**, 8626–34 (2015).
 40. Suzuki, K. *et al.* Synthesis and evaluation of a novel ^{68}Ga -chelate-conjugated bisphosphonate as a bone-seeking agent for PET imaging. *Nucl. Med. Biol.* **38**, 1011–8 (2011).
 41. Wang, Z. *et al.* Prospective Study of ^{68}Ga -NOTA-NFB: Radiation Dosimetry in Healthy Volunteers and First Application in Glioma Patients. *Theranostics* **5**, 882–9 (2015).
 42. Paeng, J. C. *et al.* Feasibility and kinetic characteristics of ^{68}Ga -NOTA-RGD PET for in vivo atherosclerosis imaging. *Ann. Nucl. Med.* **27**, 847–54 (2013).
 43. Menichetti, L. *et al.* MicroPET/CT imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin via a novel ^{68}Ga -NOTA-RGD peptidomimetic conjugate in rat myocardial infarction. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **40**, 1265–74 (2013).
 44. Yu, H. M., Chen, J. H., Lin, K. L. & Lin, W. J. Synthesis of ^{68}Ga -labeled NOTA-RGD-GE11 heterodimeric peptide for dual integrin and epidermal growth factor receptor-targeted tumor imaging. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58**, 299–303 (2015).
 45. Máté, G. *et al.* In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer (^{68}Ga)-NOTA-c(NGR). *Eur. J. Pharm. Sci.* **69**, 61–71 (2015).
 46. Kim, J. H. *et al.* Quantitative positron emission tomography imaging of angiogenesis in rats with forelimb ischemia using ^{68}Ga -NOTA-c(RGDyK). *Angiogenesis* **16**, 837–46 (2013).
 47. Zheng, K. *et al.* ^{68}Ga -NOTA-PRGD2 PET/CT for Integrin Imaging in Patients with Lung Cancer. *J. Nucl. Med.* **56**, 1823–7 (2015).
 48. Knetsch, P. A. *et al.* ^{68}Ga -NODAGA-RGD for imaging $\alpha_v\beta_3$ integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 1303–12 (2011).
 49. Pohle, K. *et al.* ^{68}Ga -NODAGA-RGD is a suitable substitute for ^{18}F -Galacto-RGD and

- can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process. *Nucl. Med. Biol.* **39**, 777–84 (2012).
50. Oxboel, J. *et al.* Comparison of two new angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl. Med. Biol.* **41**, 259–67 (2014).
 51. Chakraborty, S. *et al.* Toward realization of ‘mix-and-use’ approach in ^{68}Ga radiopharmacy: Preparation, evaluation and preliminary clinical utilization of ^{68}Ga -labeled NODAGA-coupled RGD peptide derivative. *Nucl. Med. Biol.* **43**, 116–23 (2016).
 52. Šimeček, J. *et al.* Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorg. Chem.* **51**, 577–90 (2012).
 53. Notni, J., Pohle, K. & Wester, H.-J. Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: practical consequences for the future of gallium-68-PET. *EJNMMI Res.* **2**, 1–28 (2012).
 54. Notni, J., Šimeček, J., Hermann, P. & Wester, H. J. TRAP, a Powerful and Versatile Framework for Gallium-68 Radiopharmaceuticals. *Chem. Eur. J.* **17**, 14718–22 (2011).
 55. Notni, J., Pohle, K. & Wester, H. J. Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: Preclinical evaluation of ^{68}Ga -TRAP(RGD)₃. *Nucl. Med. Biol.* **40**, 33–41 (2013).
 56. Jyo, A., Kohno, T., Teranozo, Y. & Kawano, S. Crystal Structure of the Aluminum (III) Complex of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N''-triacetate. *Anal. Sci.* **6**, 629–30 (1990).
 57. Kotek, J. *et al.* Lanthanide(III) complexes of novel mixed carboxylic-phosphorus acid derivatives of diethylenetriamine: a step towards more efficient MRI contrast agents. *Chem. Eur. J.* **9**, 5899–915 (2003).
 58. Blake, A. J. *et al.* Selective derivatisation of aza macrocycles. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **23**, 4379–87 (1996).
 59. Holub, J. *Komplexy gallia pro molekulární zobrazování kostní tkáně*. (Diplomová práce UK, 2011).
 60. Kývala, M. & Lukeš, I. *International Conference Chemometrics '95, Pardubice, Czech Republic*.
 61. NIST Standard Reference Database 46 Version 7.0 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes). (2003).
 62. Příbil, R. *Komplexometrie*. (SNTL, Praha, 1977).
 63. Okáč, A. *Analytické reakce*. (Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1965).
 64. Saveyn, P. *et al.* Solubilization of flurbiprofen within non-ionic Tween 20 surfactant micelles: a ^{19}F and ^1H NMR study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 5462–8 (2009).
 65. Beranová, T. *Komplexy hliníku pro radiomedicínské aplikace*. (Bakalářská práce UK, 2013).
 66. Drahoš, B. *et al.* Dissociation Kinetics of Mn^{2+} Complexes of NOTA and DOTA. *Dalton Trans.* **40**, 1945–51 (2011).
 67. Downs, A. J. *Chemistry of Aluminium, Gallium, Indium and Thallium*. (Blackie Academic and Professional, 1993).
 68. Clugston, M. & Flemming, R. *Advanced Chemistry*. (Oxford University Press, 2000).
 69. Bodor, a., Tóth, I., Bányai, I., Szabó, Z. & Hefter, G. T. ^{19}F NMR Study of the Equilibria and Dynamics of the $\text{Al}^{3+}/\text{F}^-$ System. *Inorg. Chem.* **39**, 2530–7 (2000).
 70. Martinez, E. J., Girardet, J. & Morat, C. Multinuclear NMR Study of Fluoroaluminate Complexes in Aqueous Solution. *Inorg. Chem.* **35**, 706–10 (1996).
 71. Farkas, E., Fodor, T., Kálmán, F. K., Tircsó, G. & Tóth, I. Equilibrium and Dissociation Kinetics of the $[\text{Al}(\text{NOTA})]$ Complex (NOTA = 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetate). *React. Kinet. Mech. Catal.* **116**, 19–33 (2015).
 72. Okoyama, T. Y., Urisaki, T. K., Inoshita, S. K. & Atsuo, S. M. ^{19}F and ^{27}Al NMR Study on the Formation of Al-EDTA-Fluoride Complex in Aqueous Solution. *Anal. Sci.* **16**, 647–8 (2000).

Poděkování

Ráda bych poděkovala své rodině a všem svým blízkým za veškerou podporu ve studiu.

Děkuji svému školiteli Vojtovi Kubíčkovvi za vedení mojí práce a za čas a ochotu vše vysvětlit. Velký dík také patří za pomoc s vyhodnocováním potenciometrických titrací.

Děkuji prof. Petru Hermannovi za cenné rady a připomínky, Honzovi Blahutovi za pomoc s plánováním NMR experimentů, Mírovi Pniokovi za rady se syntézou a studiem koordinačních vlastností fluoridů. Sandrovi děkuji za pomoc se syntézou ligandů, Zuzce Böhmové za pomoc s potenciometrickým měřením, Ondrovi Zemkovi a Markovi Belišovi za měření MS spekter.

Dále bych chtěla poděkovat Monče Paúrové za sportovní vyžití, Honzovi Bartoňovi za poklidná kafička, Tomovi Krulišovi za odpočinky v bufetu a Elišce Hacaperkové za přísun dobrůtek v laborce.

Děkuji všem členům Skupiny koordinační a bioanorganické chemie za přátelskou atmosféru.

Na závěr bych chtěla poděkovat Kubovi za trpělivost během celého studia.